

Teemu Turunen

**Laitteisto ERG-signaalin  
samanaikaiseen rekisteröintiin  
näköaistinsolukerroksesta sekä  
verkkokalvon yli**

**Sähkötekniikan korkeakoulu**

Diplomityö, joka on jätetty opinnäytteenä tarkastettavaksi  
diplomi-insinöörin tutkintoa varten Espoossa 2.12.2011.

**Työn valvoja:**

Prof. Ari Koskelainen

**Työn ohjaajat:**

TkT Frans Vinberg

TkT Hanna Heikkinen



**Aalto-yliopisto**  
Sähkötekniikan  
korkeakoulu

Tekijä: Teemu Turunen

Työn nimi: Laitteisto ERG-signaalin samanaikaiseen rekisteröintiin  
näköaistinsolukerroksesta sekä verkkokalvon yli

Päivämäärä: 2.12.2011

Kieli: Suomi

Sivumäärä: 6+64

Lääketieteellisen tekniikan ja laskennallisen tieteen laitos

Professuuri: Lääketieteellinen tekniikka

Koodi: Tfy-99

Valvoja: Prof. Ari Koskelainen

Ohjaajat: TkT Frans Vinberg, TkT Hanna Heikkinen

Valon absorptio verkkokalvon näköaistinsoluissa saa aikaan monivaiheisen biokemiallisten reaktioiden sarjan, jossa valon sisältämä tieto muunnetaan solutason sähköisiksi signaaleiksi. Näiden signaalien aiheuttamia muutoksia verkkokalvon soluvälitilan jänniteprofiilissa voidaan tutkia elektroretinogrammi-tekniikalla (ERG).

Näköaistinsolujen ERG-signaalia voidaan rekisteröidä eristetyistä verkkokalvosta kahdella tavalla: Erottamalla näköaistinsolujen vaste farmakologisesti ja rekisteröimällä potentiaalieroja koko verkkokalvon yli (TERG) tai rekisteröimällä potentiaalieroja mikroelektrodeilla vain tutkittavasta solukerroksesta (LERG).

Diplomityössä suunniteltiin ja rakennettiin laitteisto, jolla voidaan rekisteröidä samanaikaisesti LERG- ja TERG-vasteita. Laitteistoa testattiin koeohjelmalla, jossa verrattiin ulkojäsenkerroksesta rekisteröityjä LERG-vasteita ja näköaistinsolujen TERG-vasteita.

Tulosten pohjalta todettiin, että LERG-tekniikka voidaan käyttää näköaistinsolujen toiminnan kvantitatiiviseen tutkimukseen. LERG- ja TERG-vasteita vertailtaessa huomattiin, etteivät vasteiden nousunopeus, katkaisukinetiikka, nousuaika huipparvoon ja suhteelliset amplitudit poikenneet toisistaan merkittävästi. Suurin eroavaisuus oli voimakkailla valostimuluksilla TERG-vasteisiin muodostuva nopea transientti aalto. Tässä työssä tehdyt kokeet vahvistavat, että kyseinen komponentti syntyy näköaistinsolujen sisäjäsenkerroksessa.

Avainsanat: Verkkokalvo, näköaistinsolu, valovaste, TERG, LERG, CNG-kanava

Author: Teemu Turunen

Title: Device for simultaneous measurement of ERG-signal from photoreceptor layer and across the retina

Date: 2.12.2011

Language: Finnish

Number of pages:6+64

Department of Biomedical Engineering and Computational Science

Professorship: Biomedical Engineering

Code: Tfy-99

Supervisor: Prof. Ari Koskelainen

Instructors: D.Sc. (Tech.) Frans Vinberg, D.Sc. (Tech.) Hanna Heikkinen

Absorption of light by photoreceptors in the retina causes a series of biochemical reactions where the information carried by light is transformed into electrical cell level signals. The resulting changes in the voltage profile of the extracellular space can be measured with the electroretinogram technique (ERG).

The ERG signal originating in the photoreceptors can be registered from isolated retina with two different methods: By isolating the photoreceptor response pharmacologically and registering the potential difference across the whole retina (transretinal ERG) or by registering the potential difference with microelectrodes only from the desired cell layer (local ERG).

In this master's thesis, a setup was built for simultaneous measurement of LERG and TERG responses. The device was tested with experiment protocol where the LERG-responses from the outer segment and the TERG responses from the photoreceptors were compared.

Based on the results it was stated that the LERG technique can be used for the quantitative studies of photoreceptor function. When the TERG and LERG responses were compared, no significant differences were found in the rising velocity, recovery kinetics, time of the peak amplitude or in the relative amplitudes of the responses. The most notable difference was the fast transient wave in the TERG responses to bright light stimulus. The experiments conducted in this study confirm that it originates in the inner segment of the photoreceptors.

Keywords: Retina, Photoreceptor, Light response, TERG, LERG, CNG-channel

# Esipuhe

Puolentoista vuoden osa-aikainen suunnittelu- ja rakennusprojekti huipentui alle kahden kuukauden loppukiriin. Diplomityössä sain venyttää äärimmilleen teknistä- ja teoreettista osaamistani sekä loppumetreillä myös hermoja ja työaikoja. Diplomitöä saatettiin loppuun, mutta itse tutkimusprojekti on vasta aluillaan.

Haluan kiittää ohjaajiani Hanna Heikkistä ja Frans Vinbergiä sekä valvojaani Ari Koskelaista. Kaikilla kiireistä huolimatta olen saanut heiltä kaipaamaani ohjausta tarvittaessa. Heidän kanssaan käydyt keskustelut avarsivat valtavasti ymmärrystäni tutkimusalasta. Erityiskiitos Hanna Heikkiselle avusta ja ohjauksesta kirjoitusprosessin saralla. Ilman hänen apuaan diplomityö ei olisi valmistunut tavoiteajassa.

Kiitos työtoverilleni ja ystävälleni Marja Pitkäselle, joka on seurannut projektiani lähimpää. Hänen apu oli tärkeää diplomityön kannalta, mutta erityisesti yhteinen työaika on ollut rattoisaa. Olli Kotirannalle kiitos siitä, että hän on aina ollut valmis miettimään kanssani minua askarruttavia ongelmia. Yllättävän usein nämä ongelmat myös ratkesivat.

Kiitokset myös muille ystävilleni, jotka muistitte irrottaa minut tasaisesti diplomityöni syövereistä sekä Jimille kaikista hännän heilutuksista.

Otaniemi, 2.12.2011

Teemu T. Turunen

# Sisältö

<b>Tiivistelmä</b>	<b>ii</b>
<b>Tiivistelmä</b>	<b>iii</b>
<b>Esipuhe</b>	<b>iv</b>
<b>Sisällysluettelo</b>	<b>v</b>
<b>Symbolit ja lyhenteet</b>	<b>vi</b>
<b>1 Johdanto</b>	<b>1</b>
<b>2 Selkärankaisten silmä ja sen toiminta</b>	<b>3</b>
2.1 Silmän rakenne ja toiminta . . . . .	3
2.2 Verkkokalvo . . . . .	4
2.3 Näköaistinsolujen rakenne . . . . .	6
2.4 Näköaistinsolujen toiminta . . . . .	8
2.4.1 Fototransduktiokaskadin aktivaatio ja deaktivaatio . . . . .	8
2.4.2 Valovasteen aktivaatiomalli . . . . .	10
2.4.3 Fototransduktiokaskadin katkaisukinetiikkaa kuvaavat aikava- kiot . . . . .	12
<b>3 Varauksenkuljetus ja kalvovirta näköaistinsoluissa</b>	<b>15</b>
3.1 Solukalvon kalvovirta . . . . .	15
3.2 Varauksenkuljetus näköaistinsoluissa . . . . .	17
3.3 Kalvovirrat näköaistinsoluissa . . . . .	19
<b>4 ERG-signaali</b>	<b>22</b>
4.1 ERG-signaalin komponentit . . . . .	22
4.2 Näköaistinsolujen ERG-vasteen erottaminen farmakologisesti . . . . .	24
4.3 Transretinaali-ERG (TERG) . . . . .	26
4.4 Lokaali-ERG (LERG) . . . . .	28
<b>5 Laitteisto TERG- ja LERG-signaalien samanaikaiseen rekisteröintiin</b>	<b>30</b>
5.1 Ratkaisut laitteiston suunnittelussa ja toteutuksessa yleisesti . . . . .	30

5.2	Näytepidin . . . . .	30
5.3	Mikromanipulaatio ja mikroelektrodit . . . . .	33
5.4	Elatusaineliuosvirtaus ja lämmitys . . . . .	34
5.5	Häiriösuojaus . . . . .	35
5.6	Valostimulusjärjestelmä . . . . .	35
5.7	Datankeruu . . . . .	37
5.8	Mittausten kulku . . . . .	38
<b>6</b>	<b>Ulkojäsenen LERG-vasteiden ja näköaistinsolujen TERG-vasteiden vertailu</b>	<b>40</b>
6.1	Mittaustulokset . . . . .	40
6.1.1	LERG-vasteet näköaistinsolujen ulkojäsenkerroksen yli . . . .	40
6.1.2	Näköaistinsolujen TERG-vasteet . . . . .	41
6.2	LERG- ja TERG-vasteiden vertailu . . . . .	45
6.2.1	Valovasteen aktivaatio- ja katkaisukinetiikka . . . . .	47
<b>7</b>	<b>Pohdinnat</b>	<b>50</b>
7.1	Kirjallisuusvertailu . . . . .	51
7.1.1	Valovirran osuus näköaistinsolujen TERG-signalista . . . . .	52
7.1.2	Kinetiikka . . . . .	53
7.2	Laitteiston jatkokehitys . . . . .	53
7.2.1	Näytepidin . . . . .	55
7.2.2	Lämmitys . . . . .	55
7.2.3	Valostimulusjärjestelmän automatisointi ja optimointi . . . .	56
<b>8</b>	<b>Yhteenveto</b>	<b>57</b>
	<b>Viitteet</b>	<b>58</b>
	<b>Liite A Esivahvistin</b>	<b>63</b>

# Symbolit ja lyhenteet

## Symbolit

$V_m$	Kalvojännite
$V_{rev_i}$	Ionikanavan $i$ käänteispotentiaali
$A$	Aktivaatiovakio
$\Phi$	Rodopsiinin aktivaatioiden määrä sauvasolussa valostimuluksen seurauksena
$\tau_R$	Aktiivisen rodopsiinin deaktivaation aikavakio
$\tau_E$	Aktiivisen PDE:n deaktivaation aikavakio
$\tau_D$	Määräävä aikavakio
$\tau_{ND}$	Ei-määräävä aikavakio
$\tau_{rec}$	Vasteen katkaisukinetiikkaa kuvaava aikavakio

## Operaattorit

$\frac{d}{dt}$	Derivaatta muuttujan $t$ suhteen
$\int dz$	Integraali muuttujan $z$ suhteen
$\sum_i$	Summa indeksin $i$ yli
$f * g$	Funktioiden $f$ ja $g$ konvoluutio

## Lyhenteet

ERG	Elektroretinografia
TERG	Verkkokalvon yli rekisteröitävä elektroretinografia
LERG	Lokaali-elektroretinografia
CNG-kanava	Syklinen nukleotidi ohjattu kanava
cGMP	Syklinen guanosiinimonofosfaatti
ATP	Adenosinitrifosfaatti
GHK	Goldman-Hodgkin-Katz
Rh	Rodopsiini
Rh*	Aktiivinen rodopsiini
G	G-proteiini
G*	Aktiivinen G-proteiini
PDE	Fosfodiesteriini
PDE*	Aktiivinen fosfodiesteriini
CG	Guanylaattisyklaasientsyymi
GCAP	Guanylaattisyklaasientsyymiä aktivoiva proteiini
UV	Ultra-violetti
APB	2-amino-4-fosfonobutyryrihappo
LED	Light emitting diode
TTP	Time to peak

# 1 Johdanto

Näköaistimuksen ensimmäinen vaihe tapahtuu silmän takaosan valoa aistivassa hermoveverkossa, verkkokalvossa. Verkkokalvon näköaistinsolut absorboivat valoa ja muuntavat niiden energian sähköisiksi solutason signaaleiksi. Valon absorboituessa näköaistinsoluihin käynnistyy monimutkainen biokemiallisten reaktioiden sarja, joka johtaa lopulta näköhavaintoon.

Näköaistinsolut voidaan jakaa sauva- ja tappisoluihin. Sauvasolut vastaavat pääosin hämäränäöstä ja menettävät toiminnallisuutensa kirkkaissa valaistuksissa. Tappisolut vastaavat päivänäöstä ja mahdollistavat myös värien erottelun. Nisäkkäillä näköaistinsolut ovat hyvin samanlaisia ja sauvasolujen toiminnassa tai rakenteessa ei ole merkittäviä eroavaisuuksia. Siten tutkimalla hiiren näköaistinsolujen toimintaa saadaan arvokasta tietoa myös ihmisen näköaistin toiminnasta.

Näköaistinsolujen toiminta perustuu aktiiviseen varauksenkuljetukseen ja solukalvon kalvovirtojen säätelyyn. Valon absorptio sulkee näköaistinsolujen ulkojäsenten ligandiohjattuja CNG-kanavia, mistä saa alkunsa solun sähköinen vaste, kalvojännitteen muutos. Sähköistä vastetta säädellään näköaistinsolujen sisäjäsenen solukalvon jännite- ja kalsiumohjatuilla kanavilla. Solukalvon kalvovirtojen muutokset saavat aikaan muutoksia verkkokalvon soluvälitilan jänniteprofiilissa, jota voidaan mitata elektroretinogrammi-menetelmällä (ERG). Jänniteprofiilin muutokset heijastelevat tarkasti näköaistinsolujen toimintaa, joten ERG-tekniikkaa voidaan käyttää näköaistinsolujen toiminnan kvantitatiiviseen tutkimukseen.

Näköaistinsolujen ERG-vastetta voidaan rekisteröidä elävästä eläimestä, kokonaisuudesta silmästä, silmän pohjasta tai silmästä irrotetusta verkkokalvosta. ERG-signaalin tuottoon osallistuvat kaikki verkkokalvon solutyypit, joten näköaistinsolujen tuottaman vasteen erottaminen vaatii lisätoimenpiteitä. Eristetyn verkkokalvon ERG-tekniikoissa voidaan käyttää kahta lähestymistapaa näköaistinsolujen ERG-vasteen rekisteröintiin: ERG-vastetta voidaan rekisteröidä koko verkkokalvon yli (TERG) salpaamalla signaalivälitys näköaistinsoluista muuhun hermoverkkoon farmakologisesti. Siten saadaan rekisteröityä koko näköaistinsolujen tuottama ERG-vaste. Toinen tapa on erottaa näköaistinsolujen tuottama vaste mekaanisesti (LERG). Mitauselektrodit voidaan asettaa niin, että jännitemuutoksia rekisteröidään ainoastaan näköaistinsolujen ulkojäsenkerroksesta. Näin saadaan rekisteröityä vain CNG-kanavavirran muutoksia ja suoraan verrannollista ERG-vastetta. Erot TERG- ja LERG-vasteiden aikakäyttäymisessä johtuvat sisäjäsenen ionikanavien toiminnasta. Tällöin vertaamalla vasteita toisiinsa saadaan selvitettyä, muokkaavatko sisäjäsenen kanavat merkittävästi CNG-kanavavirran muutoksista seuraavaa ERG-vastetta.

Molemmilla tekniikoilla on omat hyvät ja huonot puolensa näköaistinsolujen valovasteiden tutkimisessa. TERG-tekniikalla saadaan hyvä signaali-kohinasuhde ja pystytään suorittamaan hyvin pitkäkestoisia ja stabiileja rekisteröintejä. Valovastetta tutkittaessa halutaan saada tietoa näköaistinsolujen ulkojäsenten valoherkkien kanavien toiminnasta. Kun käytetään farmakologisesti erotettua näköaistinsolujen TERG-vastetta, osallistuu vasteen muodostukseen myös näköaistinsolujen



sisäjäsenen kanavia, jotka muokkaavat rekisteröitävää signaalia. LERG-tekniikassa rekisteröinnin kohteeksi voidaan valita mikä tahansa verkkokalvon kerros. Kuitenkin tekniikassa mittauselektrodi työnnetään verkkokalvon sisään, joten se voi vahingoittaa rekisteröinnin kohteena olevia soluja. Lisäksi tekniikka on monilta osin hyvin haastava ja signaali-kohinasuhde on TERG-signaalia huomattavasti heikompi.

Diplomityön tarkoituksena oli suunnitella ja toteuttaa laitteisto, jolla voidaan rekisteröidä samanaikaisesti hiiren TERG- ja LERG-vasteita. Laitteistossa eristettyä verkkokalvoa ravitaan elatusainevirtauksen avulla, joka tarjoaa soluille fysiologisen suolapitoisuuden, elintärkeät ravinteet, luonnollisen pH:n sekä happea. Valovasteen aikaansaamiseksi verkkokalvoa stimuloidaan tarkasti säädeltävien valopulssien avulla ja vastetta rekisteröidään samanaikaisesti kahden makroelektrodin ja kahden mikroelektrodin avulla. Lisäksi verkkokalvo on suojattu ulkoisilta sähköisiltä ja mekaanisilta häiriöiltä sekä häiriövalon pääsy näköaistinsoluille on pyritty minimoimaan.

Laitteistoa testattiin suorittamalla koeohjelma, jossa rekisteröitiin samanaikaisesti näköaistinsolujen TERG-vasteita ja ulkojäsenkerroksen LERG-vasteita. Vasteiden aikakäyttäytymistä ja suhteellisia amplitudeja verrattiin toisiinsa ja vasteisiin sovitettiin yleisiä näköaistinsolututkimuksessa käytettyjä malleja. Vertailun toteuttamiseksi pyrittiin ymmärtämään ERG-signaalin syntymekanismit ja erityisesti solukalvon kanavavirtojen vaikutus vasteen muodostukseen.

Diplomityön kirjallisessa osassa tutustutaan ensin verkkokalvon ja näköaistinsolujen toimintaan. Luvussa kaksi käsitellään verkkokalvon ja näköaistinsolujen rakennetta yleisesti ja esitellään valovasteen syntyyn johtavat molekulaariset mekanismit. Lisäksi tutustutaan valovasteen aktivaatiota ja deaktivaatiota kuvaaviin yksinkertaisiin malleihin. Kolmannessa luvussa keskitytään varauksenkuljetukseen ja kalvovirtoihin näköaistinsolujen solukalvolla. Luku luo pohjan ERG-signaalin synnyn ymmärtämiselle. Luvussa neljä käsitellään ERG-signaalia ja sen eri komponentteja sekä näköaistinsolujen ERG-vasteen rekisteröinnissä käytettäviä menetelmiä. Luvussa keskitytään TERG- ja LERG-tekniikoihin.

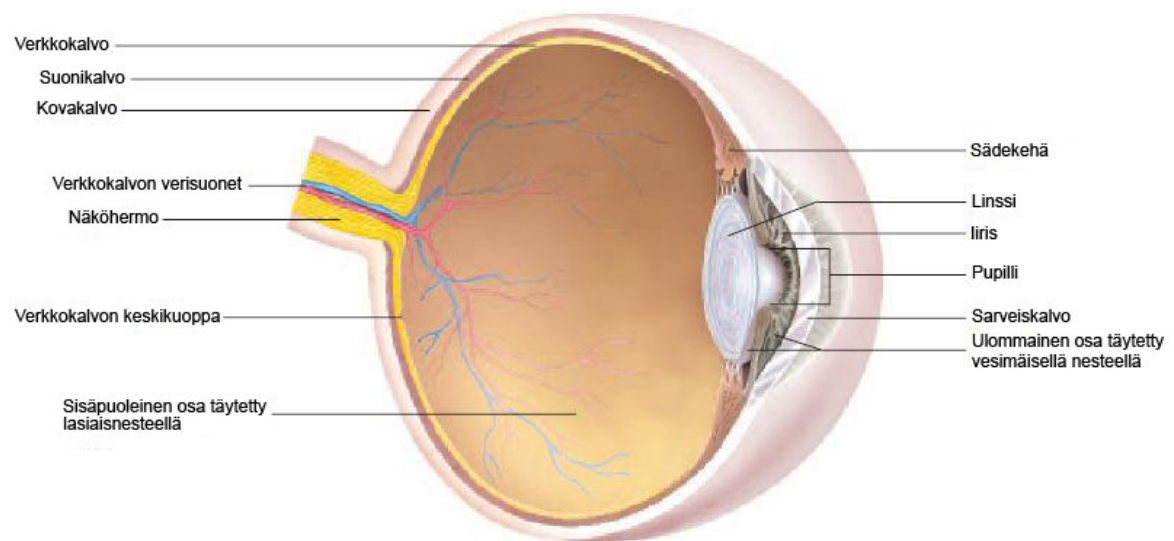
Viidennessä luvussa esitellään diplomityössä suunniteltu ja toteutettu laitteisto. Laitteistosta annetaan ensin yleiskuva, jonka jälkeen kukin laitteiston osaluokka esitellään tarkemmin. Luvussa kuusi näytetään laitteiston testaukseksi suoritettujen koeohjelman tulokset ja niiden analyysi, joiden luotettavuutta pohditaan seuraavassa luvussa. Luvussa seitsemän pohditaan myös laitteiston toimivuutta ja verrataan saatuja tuloksia kirjallisuudessa esitettyihin arvoihin. Luvussa esitellään lisäksi laitteiston jatkokehityssuunnitelmia.

## 2 Selkärankaisten silmä ja sen toiminta

Silmä on valoa aistiva elin, jonka avulla havainnoidaan ympäristöä. Eri valolähteistä, kuten auringosta, saapuva valo heijastuu ympäristön kappaleista ja kulkeutuu silmään. Silmässä valo kerätään verkkokalvolle, jossa verkkokalvon hermosolut vastaanottavat, muokkaavat ja pakkaavat valon kuljettaman tiedon hermoimpulsseiksi. Kaksi silmää, joihin samasta kohteesta saapuva valo tulee hieman eri kulmassa, mahdollistavat lisäksi etäisyyksien havainnoinnin, jolloin saadaan vaikutelma tilasta eikä ainoastaan tasomaisista pinnoista. Tässä luvussa käsitellään selkärankaisten silmän, verkkokalvon ja näköaistinsolujen rakennetta ja toimintaa pääpiirteittäin.

### 2.1 Silmän rakenne ja toiminta

Selkärankaisilla lajeilla silmä on rakenteeltaan hyvin samankaltainen. Silmän rakenne on esitetty poikkileikkauksessa 1. Valo saapuu silmään voimakkaasti valoa taittavan sarveiskalvon läpi, mistä se etenee kohti silmän pohjaa värikanalon aukon eli pupillin kautta. Pupillin kokoa säädellään valaistustasoon sopivaksi. Pupillin jälkeen valo taittuu mykiössä eli linssissä, jonka taittokykyä voidaan muuttaa ohuilla kovalkvoon kiinnittyneillä lihaksilla. Kuva tarkennetaan silmän pohjaan verkkokalvolle, jossa valon kuljettama informaatio muunnetaan aivoihin kulkeutuviksi hermoimpulsseiksi. [1]



Kuva 1: Silmän poikkileikkaus. [2], muokattu

Silmää ympäröi rakenteellisesti luja ja joustava kovakalvo, joka suojaa silmän sisempiä rakenteita. Verkkokalvon aineenvaihdunta kuluttaa jatkuvasti suuren määrän happea, energiaa ja ravinteita. Verkkokalvon ja kovakalvon välissä sijaitsee suonikalvo ja pigmenttiepiteeli. Ne huolehtivat verkkokalvon ravinteiden ja hapen saannista. [1]

## 2.2 Verkkokalvo

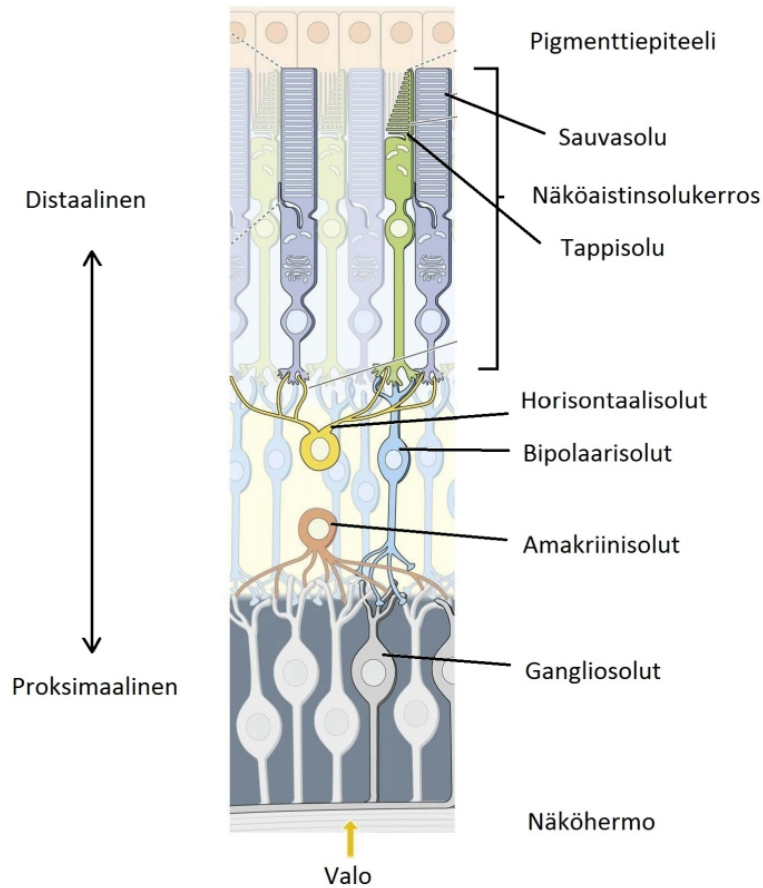
Verkkokalvo vastaa silmään tulevan valon informaation muuntamisesta aivojen ymmärtämään muotoon. Verkkokalvo rakentuu pääosin kerroksittain järjestyneestä hermosolukudoksesta. Hermokudos sisältää valoa aistivat näköaistinsolut sekä muita valon informaatiota käsitteleviä soluryhmiä. Informaatio kulkee hermoverkossa pääasiassa pitkittäissuunnassa kohti aivoja, mutta hermosoluryhmien välillä on myös paljon poikittaisia yhteyksiä.

Silmän pohjaa lähimpänä eli distaalaisella puolella sijaitsevat valoa aistivat näköaistinsolut. Silmän etupuolta eli verkkokalvon proksimaalista puolta kohti siirryttäessä seuraavana tulevat ylemmän kertaluvun hermosolut, joihin kuuluvat horisontaalisolut, bipolaarisolut ja amakriinisolut vastaavassa järjestyksessä. Signaali etenee edelleen gangliosoluille, joiden kautta vasteet kulkeutuvat näköhermoa pitkin aivoihin. Verkkokalvoon kuuluu myös muita soluja kuin hermosoluja. Lähes koko verkkokalvon läpäisevät Müllerin solut tukevat verkkokalvon rakennetta ja osallistuvat ionitasapainon säilyttämiseen. Valo kulkee verkkokalvossa ensin muiden solujen läpi osuen viimeisenä näköaistinsoluihin. Rakenne mahdollistaa hapen ja ravinteiden tehokkaan kuljetuksen näköaistinsoluille, koska näköaistinsolut sijaitsevat lähimpänä verisuonistoa. Verkkokalvon kerrosrakennetta on havainnollistettu kuvassa 2. [1]

Näköaistinsolut jakautuvat toimintansa ja rakenteensa perusteella kahteen päätyyppiin: sauvoihin ja tappeihin. Ihmisen verkkokalvossa on keskimäärin 92 miljoonaa sauvasolua ja 4,6 miljoonaa tappisolua [3]. Sauvasolut pystyvät havaitsemaan jopa yksittäisiä fotoneja, mutta saturoituvat ja menettävät toiminnallisuutensa kirkkaassa valaistuksessa. Tappisolut taas ovat aktiivisia kirkkaassa valossa ja aktivoituvat sauvoja suuremmilla valaistuksilla vastaten pääasiassa päivänäöstä ja värinäöstä. [4]

Useilla lajeilla on verkkokalvossa niin kutsuttu tarkan näön alue, joka erottelee yksityiskohtia muuta verkkokalvoa tarkemmin. Kuva tarkennetaan linssin avulla juuri tälle alueelle. Ihmisellä pistemäistä tarkan näön aluetta kutsutaan foveaksi. Tällä alueella on ainoastaan tappisolua. Esimerkiksi kilpikonnalla tarkan näön alue taas on viivamainen ja hiirellä tappisolut ovat jakautuneet melko tasaisesti ympäri verkkokalvoa. [4]

Bipolaarisolut kytkeytyvät sisemmässä synaptisessa kerroksessa näköaistinsoluihin, amakriinisoluihin ja gangliosoluihin. Ne kuljettavat informaatiota proksimaaliseen suuntaan ja muodostavat aktivoivia ja inhiboivia kytkentöjä solujen välillä. Tämän perusteella bipolaarisolut jaotellaan kahteen ryhmään: postsynaptisia hermosoluja aktivoiviin ON-bipolaarisoluihin ja inhiboiviin OFF-bipolaarisoluihin. Bipolaarisoluja on useita eri tyyppisiä ja ne voivat olla toisesta päästään kytkeytyneinä useisiin näköaistinsoluihin ja toisesta useisiin amakriini- ja gangliosoluihin. Esimerkiksi jokainen sauvasolu on kytkeytyneenä kahdesta viiteen sauvabipolaarisoluun ja yksi sauvabipolaarisolu kytkeytyneenä vastaavasti kolmestakymmenestä viiteenkymmeneen sauvaan [4]. Ihmisen fovean alueella yksittäisellä näköaistinsolulla voi kytkeytyä yhteen bipolaarisoluun, joka kytkeytyy yhteen gangliosoluun. Tästä seuraa alueen hyvä kyky erottaa pieniä yksityiskohtia. [4], [6]



Kuva 2: Selkärankaisten verkkokalvon solutyypit, niiden väliset yhteydet ja jakautuminen kerrokselliseen rakenteeseen. [5], muokattu

Horisontaalisolut ja amakriinisolut välittävät verkkokalvolla informaatiota lateraalisesti. Horisontaalisolut sijaitsevat näköaistinsolujen ja bipolaarisolujen välisessä synaptisessa kerroksessa. Jokainen näköaistinsolu kytkeytyy useisiin horisontaalisoluihin ja horisontaalisolu useisiin näköaistinsoluihin [4]. Yleisesti ottaen näköaistinsolujen valovaste aktivoi horisontaalisoluja ja niiden aktiivisuus taas vähentää horisontaalisolua ympäröivien näköaistinsolujen vasteen vaikutusta bipolaarisoluihin. Ne siis välittävät lateraalista inhibitiota. [4] Horisontaalisolujen ajatellaan parantavan kontrastia pimeään ja valoisan rajalla [7]. Amakriinisolut taas muodostavat kytköksiä bipolaarisoluista gangliosoluihin ja toisiin amakriinisoluihin sisemmässä synaptisessa kerroksessa. Amakriinisoluja on monia eri tyyppisiä ja ne vaikuttavat usein eri tavoin verkkokalvon toimintaan, mutta niiden tehtäviä ei vielä tarkoin tunneta [4].

Gangliosolut kytkeytyvät bipolaarisoluihin sekä amakriinisoluihin ja niiden aksonit muodostavat näköhermon. Gangliosolun aivoihin välittämä viesti muodostuu sen synnyttämien aktiopotentiaalien lähetystaajuudesta. Aktiopotentiaalien lähetystaajuuteen taas vaikuttaa gangliosoluun yhteyksissä olevat amakriini- ja bipolaarisolut. Yleistäen voidaan sanoa, että ON-bipolaarisolujen aktiivisuus lisää aktiopotentiaalien lähetystaajuutta ja amakriinisolujen aktiivisuus taas vähentää sitä. Ganglioso-

luja on erityyppisiä ja eri tyypit prosessoivat tiettyä osaa näköhavainnosta kuten esimerkiksi väriä tai liikettä. Gangliosolun tehtävä riippuu kuitenkin enemmänkin siihen kytkeytyneistä soluista kuin itse gangliosolun spesifeistä ominaisuuksista. [4]

Verkkokalvoon tai sen välittömään läheisyyteen kuuluvat myös Müllerin solut ja pigmenttiepiteeli. Pigmenttiepiteeli osallistuu ravinteiden ja hapen kuljettamiseen verkkokalvon hermosoluille suonikalvostosta ja sen epiteelisolut ympäröivät näköaistinsolujen ulkojäseniä. Epiteelisolut mahdollistavat sauvasolujen uusiutumisen. Lisäksi epiteeli eristää näköaistinsoluja ympäristöstä. Useilla selkärankaisilla pigmenttiepiteelin solut sisältävät tummaa melaniinia, jonka avulla ne absorboivat suuren osan verkkokalvon läpäisseeistä valosta. Tämä vähentää valon sirontaa ja heijastumista. Müllerin solut ovat lähes verkkokalvon läpi ulottuvia gliasoluja, jotka tukevat verkkokalvon rakennetta. Müllerin solut sekä pigmenttiepiteeli osallistuvat verkkokalvon ioni- ja välittäjäaineensääteelyyn sekä ylläpitävät kudoksen kemiallista tasapainoa. [4]

## 2.3 Näköaistinsolujen rakenne

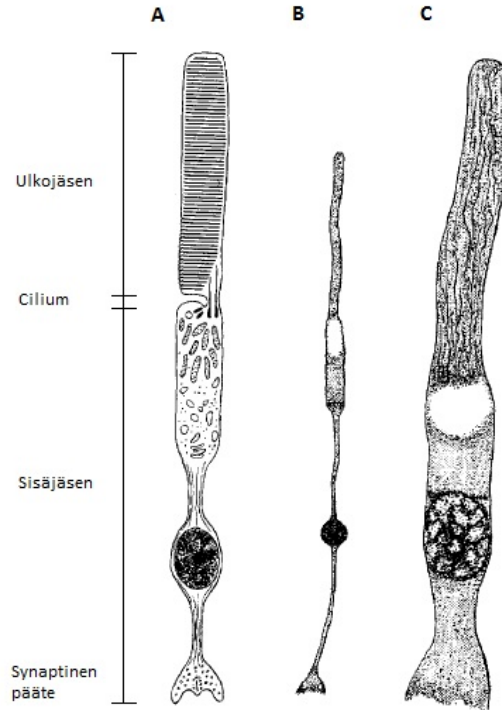
Näköaistinsolut muodostuvat kolmesta osasta: ulkojäsenestä, sisäjäsenestä ja synaptisesta päätteestä. Ulkojäsenessä sijaitsee valoa absorboivaa näköpigmenttiä, joka sijaitsee sauvasoluissa solun sisällä kiekkokalvoissa ja tappisoluissa solukalvon laskestumissa. Ulkojäsen osoittaa kohti silmän pohjaa ja on kiinnittynyt sisäjäseneseen ohuella kuromalla, ciliumilla. Sisäjäsenessä sijaitsevat solun tuma ja solun metabolian kannalta välttämättömät soluelimet. Sisäjäsenen proksimaalisessa päässä on solun synapsi. Siellä viesti muutetaan kemialliseen muotoon ja välitetään horisontaalisoluihin ja bipolaarisoluihin. Sauvasolujen rakenne on esitetty kuvassa 3. [4]

Näköaistinsolujen ulkojäsenessä sijaitsevat valoa absorboivat näköpigmenttimolekyylit koostuvat kahdesta osasta: opsiiniproteiinista ja kromoforista. Opsiini on solukalvon 7 kertaa läpäisevä kalvoproteiini ja kromofori sijaitsee opsiinin sisällä hydrofiilisessä taskussa. Selkärankaisilta on löydetty kahdenlaisia kromoforeja: A1- kromoforia (11-*cis*-retinaali) ja A2-kromoforia (11-*cis*-3,4-dehydroretinaali). Nisäkkäiltä löytyviä A1-kromoforia sisältäviä näköpigmenttimolekyyliä kutsutaan rodopsiineiksi ja A2-kromoforia sisältäviä porfyropsiineiksi. [4]

Näköaistinsolujen muoto ja koko vaihtelevat suuresti eläinlajien välillä. Vaihtelua esiintyy myös saman eläinlajin erityyppisten solujen välillä. Kuvassa 3 on vertailtu nisäkkäiden ja sammakkoeläinten sauvasoluja sekä taulukkoon 1 on poimittu eri eläinten sauvasolujen rakenteellisia mittoja.

Valon informaation muuntaminen sähköiseen muotoon tapahtuu nisäkkäillä ja sammakkoeläimillä samoihin mekanismeihin perustuen, mutta lajien välillä on huomattavia näköaistinsolujen geometriasta johtuvia eroja. Suurien näköaistinsolujensa takia sammakkoeläimiä on käytetty yleisesti näköaistintutkimuksessa ja suuri osa julkaistuista tutkimuksista on tehty sammakkoeläimillä. Nykyään nisäkkäät ja erityisesti hiiri on lääketieteessä eniten käytetty eläinmalli, koska nisäkkäslajien perimä eroaa vain vähän ihmisen perimästä. Hiiren perimää pystytään muokkaamaan tehok-

kaasti jopa yksittäisten geenien osalta. Lisäksi hiiren nopea elinkierto, lisääntyvyys ja helppohoitaisuus tekevät siitä hyvän koe-eläimen. Tämän takia myös näköaistin tutkimuksessa on siirrytty käyttämään hiiriä.



Kuva 3: Sauvasolun rakenne ja eri eläinten sauvasolujen muotoja A) Sauvasolun kaavamainen rakenne. B) Rotan sauvasolu, joka edustaa tyypillistä nisäkkään sauvasolua. C) Sammakon sauvasolu. [8], muokattu

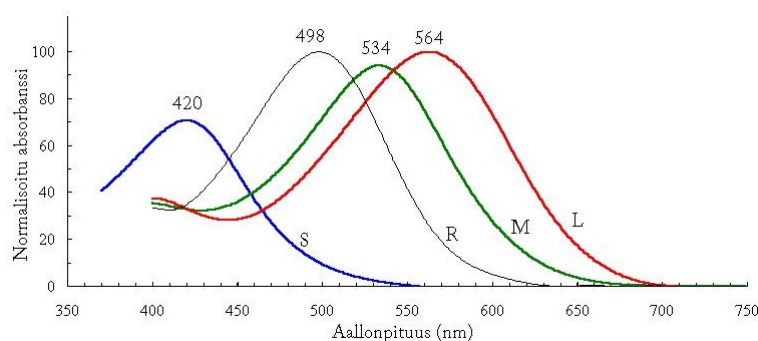
Taulukko 1: Selkärankaisten eläimien sauvasolujen koon vertailua. Hiiren sauvasolut ovat samankokoisia kuin rotan. [9 - 13]

	Sammakko		Salamanteri		Rotta	
	pituus	Ø	pituus	Ø	pituus	Ø
Ulkojäsen ( $\mu\text{m}$ )	55	6	25	10	24	1,7
Cilium ( $\mu\text{m}$ )	0,42	0,44	-	-	2	0,41
Sisäjäsen ( $\mu\text{m}$ )	65	1-6	<45	8	71,3	0,43-6,3

## 2.4 Näköaistinsolujen toiminta

Näköaistinsolut vastaavat fotonien absorptiosta ja valoenergian muuttamisesta sähköiseksi signaaliksi. Tähän johtava tapahtumaketju on pääpiirteittäin samanlainen sauva- ja tappisoluiissa.

Eri lajeilla ja eri solutyypeissä on erilaisia näköpigmenttejä. Kukin näköpigmentti absorboi fotoneja sille ominaisen absorptiospektrin mukaan. Ihmisillä on vain yhdenlaisia sauvoja, mutta kolme erilaista tappisolutyyppeä, joilla on kaikilla erilainen absorptiospektri. Tämä mahdollistaa ihmisen värinäön. Ihmisen näköaistinsolujen spektrit on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4: Ihmisen näköaistinsolujen absorptiospektrit. S = siniherkät tapit (short wavelength), M = viherherkät tapit (middle wavelength), L = punaherkät tapit (long wavelength) ja R = sauvasolut. [14], muokattu

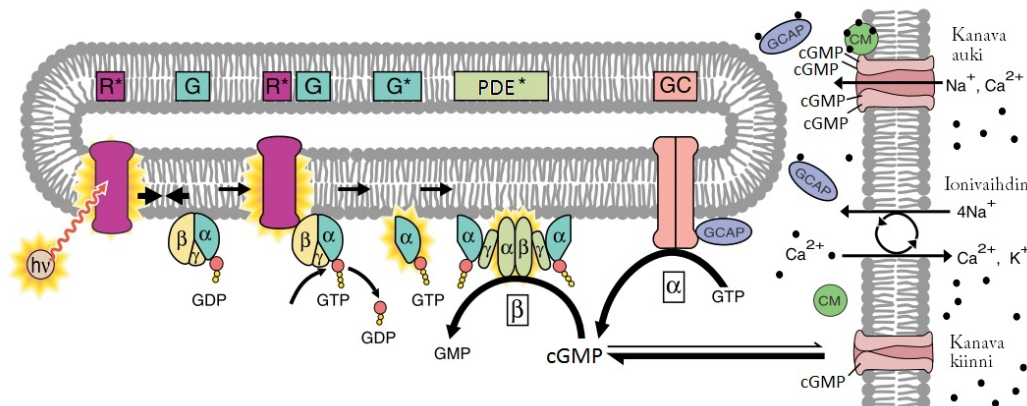
Ihmisen näköaistin toimintaa voidaan selvittää tutkimalla hiiren näköjärjestelmää. Heikoissa valaistuksissa toimiva sauvasolunäkö on molemmilla lajeilla samankaltainen ja sauvasoluissa ei ole merkittäviä toiminnallisia eikä rakenteellisia eroja. Suurimmat eroavaisuudet ovat lajien tappisolunäössä. Ihmisen tappisolut ovat keskittyneet voimakkaasti fovean alueelle, kun taas hiiren tappisolut ovat jakautuneet tasaisesti koko verkkokalvoon. Ihmisen tappioiden herkkyysmaksimit ovat sinisen, vihreän ja punaisen valon aallonpituusalueella ja hiirellä vastaavasti UV ja vihreän valon aallonpituudella. [15]

### 2.4.1 Fototransduktiokaskadin aktivaatio ja deaktivaatio

Valon absorptio näköaistinsoluun aiheuttaa monivaiheisen biokemiallisten reaktioiden sarjan, jota kutsutaan fototransduktiokaskadiksi. Solun reaktiota valostimulusseen kutsutaan yleisesti valovasteeksi. Kaskadi on esitetty kuvassa 5.

Kromoforin absorboidessa fotonin sen sisältämä *cis*-sidoksia suoristuu *trans*-muotoon, jolloin kromofori pitenee. Tämä saa aikaan konformaatiomuutoksen myös opsiinissa, jolloin rodopsiini (Rh) muuttuu aktiiviseen muotoon (Rh\*). Kiekkokalvolla diffuusion avulla liikkuva aktiivinen rodopsiini aktivoi kohtaamiaan G-proteiineja, transdusiineja. Kukin aktiivinen transdusiinimolekyyli sitoutuu yhteen fosfodies-

teraasimolekyylin (PDE) muuntaen sen aktiiviseen muotoon ( $PDE^*$ ). Aktiivinen  $PDE^*$  katalysoi syklisen guanosinimonofosfaatin (cGMP) hydrolyysiä, mikä johtaa cGMP:n konsentraation laskuun sytoplasmassa. [4]



Kuva 5: Fototransduktiokaskadin aktivaatiovaihe. [16], muokattu

Ulkojäsenessä on ns. valoherkkiä CNG-kanavia, joissa on sitoutumispaikkoja neljälle cGMP-ligandille. Valon absorptio saa aikaan cGMP:n konsentraation laskun, mikä pienentää avoimien CNG-kanavien määrää ja siten ionivirtaa CNG-kanavien läpi. Tämä johtaa solukalvon hyperpolarisaatioon, joka etenee synapsialueelle vähentäen välittäjäaineen (glutamaatin) vapautusta synapsirakoon. Glutamaatin erityksen vähentyminen viestittää toisen asteen neuroneille valon vastaanotosta, ja signaali välittyy eteenpäin hermoverkossa. [4]

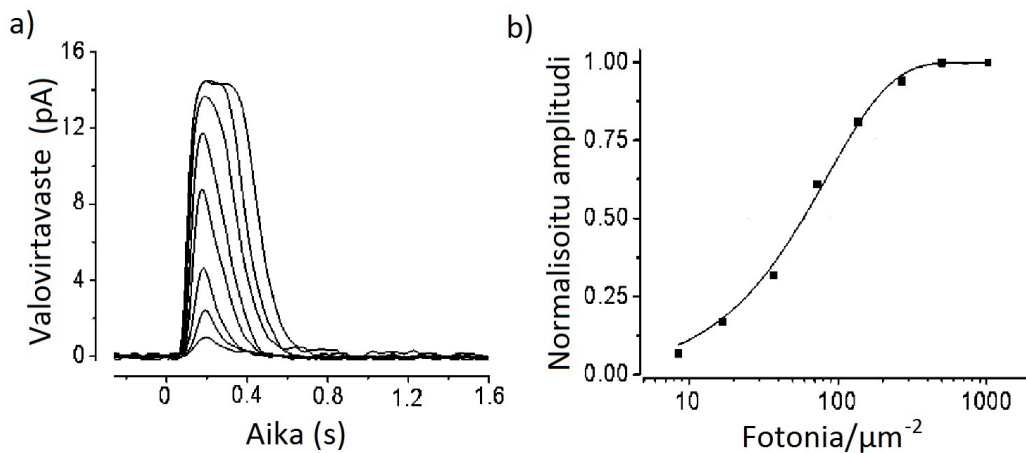
Fototransduktioon osallistuvat molekyylit deaktivoituvat itsestään tai ne deaktivoitetaan. Kalsiumpitoisuuden lasku valovasteen aikana toimii deaktivaation tehostajana. CNG-kanavien sulkeutuminen vähentää kalsiumionien sisäänvirtausta solun ulkojäseneseen. Kuitenkin kalsiumionien kuljetus ulos ulkojäsenen  $Na^+/Ca^{2+}, K^+$ -vaihtajien kautta jatkuu. Tämä johtaa ulkojäsenen kalsiumionikonsentraation laskuun, mikä laukaisee useat fototransduktioketjun deaktivaatiomekanismit. Kalsium toimii siis negatiivisena takaisinkytkentänä fototransduktioketjuun. [17]

cGMP:n synteesin katalysoinnista ulkojäsenessä vastaava guanylaattisyklaasientsyymi (GC) on sauvasolun 1-fotonivasteiden kannalta merkittävin katkaisunsäätömekanismi. 1-fotonivasteessa sauvasolu absorboi ainoastaan yhden fotonin, joten sauvasolussa aktivoituu yksi rodopsiinimolekyyl. Katalysointimekanismeissa kalsiumionit sitoutuvat guanylaattisyklaasientsyymiä aktivoivaan proteiiniin (GCAP), jolloin GCAP ei pysty aktivoimaan guanylaattisyklaasin toimintaa. Kalsiumpitoisuuden lasku saa kalsiumionit irtoamaan GCAP:sta, GC:n katalyysitehokkuus paranee ja cGMP:n synteesi nopeutuu. Kalsiumkonsentraation lasku myös nopeuttaa  $Rh^*$ :n deaktivaatiota ja nopeuttaa näin valovasteen katkaisua. Nämä mekanismit tehostavat solun palautumista pimeätilaan.

Ulkojäsenen kanavavirran muutoksia valon absorptio seurauksena kutsutaan valovirtavasteeksi. Se muodostuu pääosin CNG-kanavavirran muutoksista, mutta pienen



osa valovirtavasteesta muodostavat myös ulkojäsenen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}, \text{K}^+$ -vaihtajat. Käytettäessä lyhyitä valostimuluksia heikoilla valostimuluksen voimakkuuksilla CNG-kanavien aukiolo käyttäytyy lineaarisesti valon voimakkuuden suhteen. Siten valon voimakkuuden kaksinkertaistaminen sulkee kaksinkertaisen määrän CNG-kanavia. Näitä vasteita kutsutaan lineaarisen alueen vasteiksi. Suurilla valon voimakkuuksilla kaikki CNG-kanavat sulkeutuvat, joten valon voimakkuuden lisääminen ei enää kasvata valovirtavastetta. Tällaisia vasteita kutsutaan saturoituneiksi vasteiksi. Valon voimakkuuden kasvaessa saturaatioaika kasvaa, koska cGMP:n konsentraation palautumiseen kuluva aika kasvaa. Valovirtavasteita ja niiden käyttäytymistä ajan ja valostimuluksen voimakkuuden funktiona on esitelty kuvassa 6.



Kuva 6: Hiiren valovirtavasteita eri valostimuluksen voimakkuuksilla. Valostimuluksen voimakkuus on kasvatettu n. kaksinkertaiseksi vasteiden välillä. Stimuluksen kesto 10 ms. a) Valovirta ajan funktiona. b) Valovirtavasteiden normalisoitu toimintakäyrä eli amplitudit valostimuluksen voimakkuuden funktiona. Normalisointi on tehty saturaatiotasolle. Valovirtavasteista kaksi pienintä ovat lineaarisella alueella ja kaksi suurinta vastetta ovat saturoituneita vasteita. [18], muokattu

#### 2.4.2 Valovasteen aktivaatiomalli

Näköaistinsolun fototransduktiokaskadi on yksi parhaiten tunnettuja solun biokeemiallisten reaktioiden sarjoja. Näköaistinsolujen vaste valostimuluksille pystytään mallintamaan jo melko hyvin ja mallit tarkentuvat sitä mukaan kuin eri molekyylien pitoisuuksia ja reaktionopeuksia solussa saadaan selvitettyä.

Pelkistetyin molekyylitason valovastemalli on Lambin ja Pugh'n vuonna 1992 julkaissama aktivaatiomalli, joka kuvaa tilannetta, jossa kaikki valoimpulssin aktivoimat molekyylit jäävät aktiivisiksi. Se ei siis ota kantaa valovasteen katkaisuun. Malli kuvaa hyvin valovasteen alkuvaihetta, mutta alkaa nopeasti poiketa valovasteesta, kun valovasteen katkaisumekanismi kytkeytyvät reaktiosarjaan. [19]

Molekyylitason reaktioiden pohjalta valovasteen aktivaatiota pystytään kuvaamaan ns. viivästytetyllä Gaussisella käyttäytymisellä, jossa aktivaatiota voidaan mallintaa

valostimuluksen voimakkuuden  $\Phi$ , aktivaatiovakion  $A$  ja viipeen  $t_d$  avulla. Näiden avulla johdettu Gaussinen kuvaaja on muotoa

$$F(t) = e^{-\Phi A(t-t_d)^2/2}. \quad (1)$$

Aktivaatiovakio  $A$  sisältää kaskadin vahvistukseen vaikuttavat parametrit

$$A = \nu_{RG} c_{GE} \beta_{sub} n_{cGMP}. \quad (2)$$

$\nu_{RG}$  kuvaa nopeutta, jolla yksittäinen aktiivinen rodopsiini  $R^*$  aktivoi G-proteiineja. G-proteiinien pitoisuus on kiekkokalvoilla niin suuri, että aktiivisen rodopsiinin voidaan olettaa kohtaavan G-proteiineja tasaisella nopeudella.  $c_{GE}$  on kytkentäkerroin, joka kuvaa PDE\* ja G\*:n syntynopeuksien suhdetta ( $0 < c_{GE} < 1$ ). Koska proteiinien diffuusionopeus solukalvolla on äärellinen ja PDE-molekyylien konsentraatio on huomattavasti G-proteiinien konsentraatiota pienempi, G\*:ia syntyy nopeammin kuin PDE\*:a.  $t_d$  kuvaa lyhyttä yhteenlaskettua viivettä, joka muodostuu rodopsiinin aktivaatioon, G-proteiinien ja  $R^*$  kohtaamiseen sekä G\*:n ja PDE:n sitoutumiseen kuluva ajasta.  $\beta_{sub}$  kuvaa keskimääräistä nopeutta, jolla yksi PDE\*-molekyyli hydrolysoi cCMP:tä solulimasta [mol/s].  $n_{cGMP}$  on ns. Hillin vakio, joka kuvaa kuinka monta cCMP-molekyyliä täytyy vähintään olla sitoutunut, jotta CNG-kanava olisi auki. [19]

Mallia voidaan sovittaa näköaistinsolujen soluvälitilan virtojen tai jännitteen muutoksiin. Näköaistinsolujen soluvälitilan virta  $J$  pienenee valon vaikutuksesta, koska CNG-kanavavirta pienenee. Siten virran  $J(t)$  suhdetta voidaan verrata virtaan  $J_0$  alkuhetkellä ( $t = 0$ ). Jännitemittauksissa voidaan käyttää jännitteen  $R(t)$  poikkeamaa suhteessa valovasteen saturaatiotasoon  $R_{sat}$  eli tilaan, jossa kaikki CNG-kanavat ovat sulkeutuneet. Sovitus voidaan tehdä jännitevasteiden alkuhetkiin, jossa jänniteherkät mekanismit eivät vielä vaikuta vasteen kinetiikkaan.

$$\frac{R(t)}{R_{sat}} = 1 - \frac{J(t)}{J_0} = 1 - e^{-\Phi A^*(t-t_d)^2/2}. \quad (3)$$

Koska malli ei huomioi valovasteen katkaisumekanismia, sitä voidaan sovittaa vain rajoitetulle alueelle vasteen alkuhetkiin. Aktiivisen rodopsiinin ja G-proteiinien deaktivaatio sekä guanilyyttisyklaasin (GC) katalyyssitehokkuuden kasvu pienentyneen solusisäisen kalsiumkonsentraation seurauksena ovat tärkeimmät valovasteen katkaisumekanismeista [19]. Hiirellä aktiivisen rodopsiinin deaktivaatio tapahtuu n. 40 ms aikavakioilla [20]. Siten deaktivaatio on merkityksellistä jo hyvin varhaisilla hetkillä ja aktivaatiomallia voidaan sovittaa n. 20 ms vasteen alkuhetkestä.

Voimakkailla stimuluksilla, joissa stimulus aktivoi yli  $10^5$  rodopsiinimolekyyliä saavaselua kohti ( $\phi > 10^5$ ), mallin ei voida enää olettaa pätevän [19]. Heikoilla valostimuluksilla oletetut solun valovaste ei enää ole riippumaton näköaistinsolun kohdasta, jossa fotonin absorbointi tapahtuu, vaan CNG-kanavia sulkeutuu paikallisesti, joten malli ei enää päde heikoilla valostimuluksilla. Näillä rajoituksilla mallia voidaan sovittaa valostimulusten voimakkuuksilla, jotka ovat arviolta välillä  $10 < \phi < 10^5$ .

### 2.4.3 Fototransduktiokaskadin katkaisukinetiikkaa kuvaavat aikavakiot

Jotta näköaistinsolut palautuisivat valon absorptiota edeltävään tilaan, täytyy valovasteen syntyyn osallistuvat aktiiviset molekyylit deaktivoida. Siten aktiivisten molekyyli deaktivaationopeus määrää nopeuden, jolla vaste voi palautua alkutilaan. Näköaistinsolujen vasteen katkaisussa merkittäviä tekijöitä ovat aktiivisen rodopsiinin ja  $PDE^*$ :n deaktivaatio, jotka määräävät cGMP:n hajotusnopeuden, sekä guanylaattisyklaasientsyymin (GC) katalyysitehokkuus.

Rodopsiinin ja  $PDE$ :n deaktivaation voidaan olettaa noudattavan ensimmäisen asteen reaktiokinetiikkaa, jossa molekyyliä  $A$  hajotetaan aikavakiolla  $\tau$ .

$$\frac{dA}{dt} = -\frac{1}{\tau}A, \quad (4)$$

joten  $A$ :n konsentraatioksi ajan suhteen saadaan

$$[A](t) = Ce^{-\frac{t}{\tau}}. \quad (5)$$

Kun rodopsiinimolekyyliä deaktivoidaan valostimuluksen jälkeen, noudattaa aktiivisten rodopsiinimolekyylien pitoisuus yhtälöä

$$Rh^*(t) = \Phi e^{-\frac{t}{\tau_R}}, \quad (6)$$

missä  $\Phi$  kuvaa valostimuluksen aktivoimien rodopsiinien määrä. [19] , [21]

$PDE$ :n deaktivaatio noudattaa samanlaista käyttäytymistä, joten aktiiviselle  $PDE$ :lle saadaan yhtälö

$$PDE^*(t) = \nu_{RE} e^{-\frac{t}{\tau_E}}, \quad (7)$$

missä  $\nu_{RE} = \nu_{RG}c_{GE}$  kuvaa nopeutta, jolla aktiivinen rodopsiini aikaansaa  $PDE$ -molekyylien aktivaatiota. Koska aktiivinen rodopsiini aktivoi koko ajan lisää  $PDE$ -molekyyliä ja aktiivista rodopsiinia deaktivoituu jatkuvasti, saadaan  $PDE^*$ :n aika-riippuvuus yhtälöiden (6) ja (7) konvoluutiona.

$$PDE^*(t) = \Phi [e^{-\frac{t}{\tau_R}} * \nu_{RE} e^{-\frac{t}{\tau_E}}] = \Phi \nu_{RE} \frac{\tau_D \tau_{ND}}{\tau_D - \tau_{ND}} (e^{-\frac{t}{\tau_D}} - e^{-\frac{t}{\tau_{ND}}}), \quad (8)$$

missä  $\tau_D$  on aikavakioista  $\tau_R$  ja  $\tau_E$  määräävä sekä  $\tau_{ND}$  ei-määräävä. Jos oletetaan toisen reaktion olevan paljon toista nopeampi ja tarkastellaan riittävän myöhäistä ajanhetkeä, saadaan yhtälö (8) supistumaan muotoon

$$PDE^*(t) \approx \Phi C e^{-\frac{t}{\tau_D}}, \quad (9)$$

missä vakio  $C$  sisältää yhtälön vakiotermit. [20], [22] Yleisen käsityksen mukaan hiirellä aktiivinen  $PDE$  deaktivoituu rodopsiinia huomattavasti hitaammin, joten  $\tau_D$  kuvaa  $PDE^*$ :n deaktivaation aikavakiota  $\tau_E$  [20], [55].

Valovasteen katkaisukinetiikkaan vaikuttaa myös cGMP:n synteesinopeus. Valittaessa valovasteen tila, jossa cGMP:n taso sekä cGMP:n synteesinopeus ovat vakioita, saadaan

$$\frac{d[cGMP]}{dt} = \alpha + \beta[cGMP] = \text{vakio}, \quad (10)$$

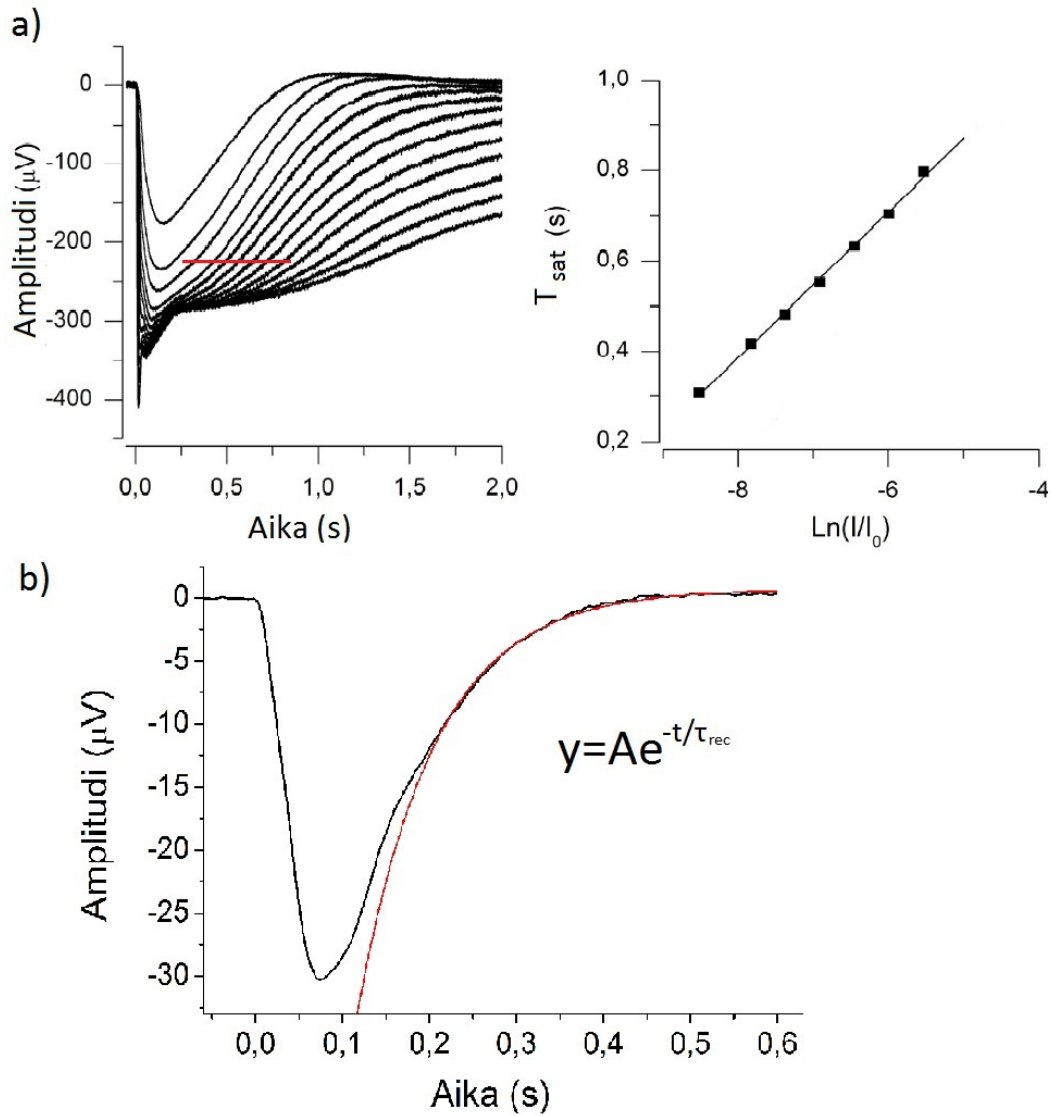
missä  $\alpha$  on cGMP:n synteesinopeus ja  $\beta$  nopeus, jolla cGMP:ta hajoitetaan. Saturoivan valostimuluksen jälkeen solunsisäinen kalsiumpitoisuus laskee minimiin. Tällöin cGMP:n synteesinopeus on vakio. Kalsiumpitoisuuden muutoksessa kestää riittävän kauan, että cGMP-taso ehtii nousta tasaisella nopeudella satuuraatiotilasta paluun alkuhetkillä. Siten riittävän lyhyellä ajanhetkellä saturaatiotilan jälkeen  $\alpha$  voidaan olettaa vakioksi.  $\beta$  on suoraan verrannollinen PDE\*:n konsentraatioon. Yhdistämällä yhtälöt (9) ja (10) päädytään yhtälöön

$$t_{sat} = \tau_D \ln \Phi + \text{vakio}, \quad (11)$$

missä  $t_{sat}$  on ajanhetki, jossa cGMP-taso sekä cGMP:n muutosnopeus ovat vakioita. [19], [21]

Kun saturoitunut valovaste on palautunut n. 20 % saturaatiotasolta, cGMP:n konsentraatio ja konsentraation muutosnopeus ovat vakioita. Aika  $t_{sat}$ , jossa vaste saavuttaa tämän tason, muuttuu valon voimakkuuden funktiona. Kun käytetään eri saturoivia valostimuluksen voimakkuuksia  $\Phi$  ja määritetään  $t_{sat}$  jokaiselle saturoituneelle vasteelle samalta tasolta, voidaan määrittää yhtälön (11) mukainen suora. Suoran kulmakertoimesta saadaan fototransduktiokaskadin katkaisukinetiikkaa kuvaava aikavakio  $\tau_D$ . [21]

Toinen fototransduktiokaskadin katkaisukinetiikkaa kuvaava aikavakio,  $\tau_{rec}$ , voidaan määrittää sovittamalla eksponentiaalifunktiota riittävän myöhäisille hetkille heikon valostimuluksen tuottaman vasteen paluuseen. Siten  $\tau_{rec}$  saadaan eksponenttifunktion aikavakiosta. Aikavakioiden  $\tau_D$  ja  $\tau_{rec}$  oletetaan hiirellä kuvaavan saman fysiologisen reaktion deaktivaation nopeutta. Katkaisukinetiikkaa kuvaavien aikavakioiden määritystä on havainnollistettu kuvassa 7.



Kuva 7: a)  $t_{\text{sat}}$  ja  $\tau_D$  määrittäminen [23].  $t_{\text{sat}}$  on ajanhetki, jossa kaikki saturoituneet vasteet ovat palautuneet saturaatiosta samalle tasolle ja vasteiden nousunopeus on sama.  $\tau_D$  voidaan määrittää  $t_{\text{sat}}$ :n ja valonvoimakkuuden muutoksen suhteesta. b) Pienivasteen paluuta määrävän aikavakion,  $\tau_{\text{rec}}$ , määrittäminen.

### 3 Varauksenkuljetus ja kalvovirta näköaistinsoluissa

Näköaistinsolut kuluttavat jatkuvasti suuren määrän energiaa ja valtaosa tästä energiasta kuluu aktiiviseen varauksenkuljetukseen. Pimeäadaptoituneen näköaistin solun sisäpuoli on negatiivisesti varautunut solunulkoiseen tilaan nähden ja kalvojännitteen suuruus on n. -35...-40 mV [4]. Tämän kalvojännitteen aikaansaamiseksi ja sen ylläpitämiseksi näköaistinsoluissa on aktiivisesti pidettävä yllä ionien konsentraatiogradientteja.

Ionit eivät pysty läpäisemään solukalvon lipidikaksoiskerrosta. Solukalvolla on varauksenkuljetukseen erikoistuneita kalvoproteiineja, joiden kautta ionit pääsevät siirtymään kalvon läpi. Varauksenkuljetus voidaan jakaa aktiiviseen ja passiiviseen varauksenkuljetukseen. Aktiivisessa varauksenkuljetuksessa ioninkuljettimet käyttävät ulkoista energiaa siirtääkseen ioneja. Ulkoinen energia saadaan käyttämällä mm. korkeaa energiaa ATP-molekyylejä tai toisen ionin sähkökemiallista gradienttia.

Passiivisessa varauksenkuljetuksessa ionit liikkuvat sähkökemiallisen konsentraatiogradienttinsa mukaisesti ionikanavien kautta. Yhden ionikanavan läpi voi kulkea jopa 100 miljoonaa ionia yhden sekunnin aikana. Tämä on  $10^5$  kertaa nopeampaa kuin aktiivisilla kuljetusmenetelmillä. Solukalvolla on vuotokanavia, jänniteohjattuja kanavia sekä ligandiohjattuja kanavia, jotka voivat olla hyvin spesifejä niitä läpäiseville ioneille. Vuotokanavat ovat suuren osan ajasta auki ja ionit voivat läpäistä ne vapaasti. Jänniteohjattujen kanavien läpäisevyyttä säädellään solukalvon jännitteen ja ligandiohjattuja kanavia niiden reseptoreihin kiinnittyvien ligandien avulla. [24]

#### 3.1 Solukalvon kalvovirta

Kalvojännitteelle ja kalvovirroille käytetään merkkisääntöjä. Kalvojännitettä mitattaessa soluliman potentiaalista vähennetään soluvälitilan potentiaali. Soluvälitilan potentiaali valitaan nollapotentiaaliksi. Solusta ulospäin suuntautuva virta on positiivista ja soluun sisäänpäin kulkeva virta negatiivista. [25]

Solukalvon ionivirroille on kaksi ajavaa tekijää: potentiaaliero ja konsentraatioero kalvon sisä- ja ulkopuolen välillä. Jokainen yksittäinen ionilaji pyrkii tasapainoon, jossa potentiaalieron ja konsentraatioeron aiheuttamat voimat kumoavat toisensa. Kalvojännitettä, jossa ionilaji on sähkökemiallisessa tasapainossa, kutsutaan tämän ionilajin Nernstin potentiaaliksi

$$E_i = \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{C_{out}}{C_{in}}, \quad (12)$$

missä  $R$  on molaarinen kaasuvakio,  $T$  lämpötila,  $z_i$  ionilajin varaus,  $F$  Faradayn vakio sekä  $C_{in}$  ja  $C_{out}$  ionin konsentraatiot solukalvon sisä- ja ulkopuolella. [26]

Kukin ionilaji pyrkii hakeutumaan Nernstin potentiaalin määrittämään tasapainoon, mutta ionilajeja pidetään aktiivisella varauksenkuljetuksella epätasapainossa.

Solu on lepotilassaan stationääritilassa, jota se voi muuttaa nopeasti säätelämällä solukalvon ionikanavien läpäisevyyttä.

Aktiivinen ioninkuljetus pitää solukalvon negatiivisessa kalvojäännitteessä  $V_m$ , joten kullekin ionilajille muodostuu ioneja ajava potentiaaliero

$$\Delta V = V_m - E_i. \quad (13)$$

Sama yhätlö pätee myös ionikanavien käänteispotentiaalille  $V_{rev_i}$ , koska  $V_{rev_i}$ -arvolla kyseisen kanavan virtaa ajava potentiaaliero kääntyy vastakkaissuuntaiseksi ja siten kanavavirranvirran suunta kääntyy. [25]

Solukalvossa on konduktansseja (resistanssin käänteisarvo) eri ionilajeille. Siten kalvovirraksi kullekin ionilajille muodostuu

$$K_{m_i} = g_i(V_m - E_i), \quad (14)$$

missä  $K_m$  on ionilajin kalvovirran tiheys ja  $g_i$  solukalvon konduktiivisuus kyseiselle ionilajille.

Stationääritila, johon solukalvo pyrkii asettumaan, riippuu kaikkien solukalvon läpäisevien ionilajien yhteisvaikutuksesta. Solukalvon stationääritilan potentiaali  $E_r$  saadaan Goldman-Hodgkin-Katz -yhtälöstä (GHK), joka ottaa huomioon kunkin ionilajin sisäisen ja ulkoisen konsentraation sekä solukalvon permeabiliteetin eli läpäisevyyden kyseiselle ionilajille. Tätä potentiaalia kutsutaan yleisesti GHK-potentiaaliksi. GHK-yhtälö yksiarvoisille ioneille on

$$E_r = \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum_i P_{M_i^+} [M_i^+]_{out} + \sum_i P_{A_i^-} [A_i^-]_{in}}{\sum_i P_{M_i^+} [M_i^+]_{in} + \sum_i P_{A_i^-} [A_i^-]_{out}}, \quad (15)$$

missä  $P_i$  on solukalvon permeabiliteetti kullekin ionilajille,  $[M_i^+]$  kationilajin konsentraatio ja  $[A_i^-]$  anionilajin konsentraatio. Yhtälö ei huomio aktiivista varauksenkuljetusta. Solukalvon potentiaali määräytyy pääasiassa kaliumin, natriumin ja kloridin vaikutuksista. Siten GHK-yhtälö saa muodon [25]

$$E_r = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na^+} [Na^+]_{out} + P_{K^+} [K^+]_{out} + P_{Cl^-} [Cl^-]_{in}}{P_{Na^+} [Na^+]_{in} + P_{K^+} [K^+]_{in} + P_{Cl^-} [Cl^-]_{out}}. \quad (16)$$

Nettokalvovirtaa ajava potentiaaliero saadaan kalvojäännitteen poikkeamasta GHK-yhtälön mukaisesta tasapainosta. Kalvovirtaan vaikuttaa myös kapasitiivinen virta, joten ionivirrantiheys kalvon läpi saadaan nettokalvovirran  $\sum_i K_{m_i}$  ja kapasitiivisen virran  $J_C$  summana

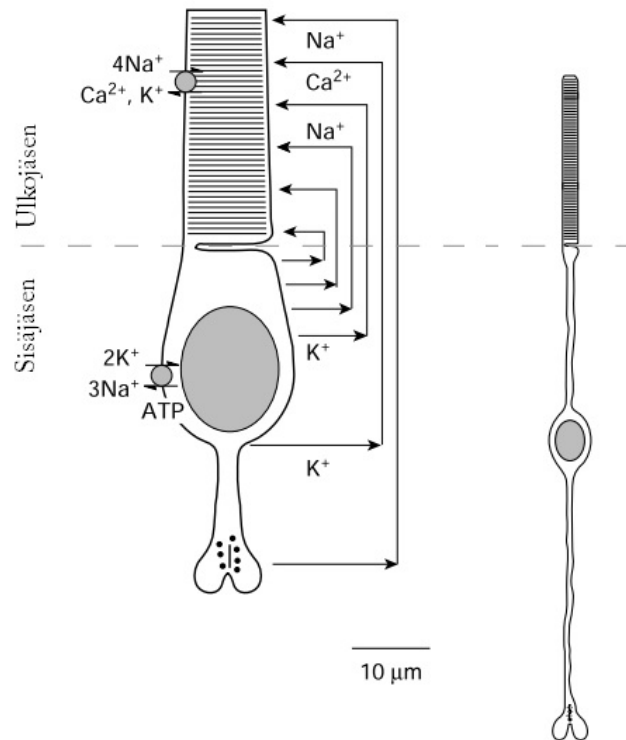
$$J = \sum_i K_{m_i} + J_C = G(V_m - E_r) + C \frac{dV_m}{dt}, \quad (17)$$

missä  $E_r$  on GHK-potentiaali,  $G$  solukalvon konduktiivisuus ja  $C$  solukalvon kapasitanssi.

### 3.2 Varauksenkuljetus näköaistinsoluissa

Ionipumput ylläpitävät näköaistinsoluissa ionien konsentraatiogradientteja, jonka seurauksena ulko- ja sisäjäsenen välillä kiertää pimeäadaptoituneessa tilassa jatkuva ionivirta. Tätä virtaa kutsutaan pimeävirraksi. Pimeävirta on esitetty kuvassa 8. Pimeävirran nieluna toimivat ulkojäsenen valoherkät ligandiohjatut CNG-kanavat ja lähteenä sisäjäsenen kationikanavat. Pimeävirran suuruus on lajista riippuen 10–70 pA [16], [18].

**CNG-kanavista** pääsee virtaamaan soluun pääasiassa  $\text{Na}^+$ - ja  $\text{Ca}^{2+}$ -ioneja (myös  $\text{K}^+$ - ja  $\text{Mg}^{2+}$ -ioneja) sähkökemiallisen gradienttinsa suuntaisesti. Kanavien ioniläpäisevyyttä säädelään niihin kiinnittyvien cGMP-ligandien konsentraation avulla. CNG-kanavissa on solukalvon sisäpuolella neljä sidospaikkaa cGMP-ligandille. Kanavan aukiolotodennäköisyys kasvaa cGMP:n sitoutuessa kanavan reseptoreihin ja se on auki suurella todennäköisyydellä, kun siihen on sitoutunut vähintään 3 cGMP-ligandia [27]. Valo pienentää soluliman cGMP-konsentraatiota ja siten avointen CNG-kanavien määrää, minkä seurauksena myös kiertävä pimeävirta pienenee.



Kuva 8: Pimeäadaptoituneessa näköaistinsolussa kiertävät ionivirtaukset eli pimeävirta. Nettovirran lähteenä toimivat pääasiassa sisäjäsenen  $\text{K}_x$ -kanavat ja nieluna ulkojäsenen CNG-kanava. Pimeävirtaa on havainnollistettu salamannerin sauvasolussa. Kuvassa mukana myös samaan mittakaavaan piirretty nisäkkään sauvasolu. [16], muokattu

Näköaistinsolun ulkojäsenessä sijaitsevat myös valovasteen vahvistuksen säätelyn kannalta tärkeät  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}, \text{K}^+$ -vaihtajat. Yhden vaihtokierroksen aikana vaih-



taja siirtää solun ulkopuolelle yhden  $\text{Ca}^{2+}$ -ionin ja yhden  $\text{K}^+$ -ionin samalla kun se päästää neljä  $\text{Na}^+$ -ionia solun sisäpuolelle. Vaihtajan toiminta aiheuttaa nettovirran soluvälitilasta soluun. Stationääritilassa vaihtaja vakioi solunsisäisen kalsiumkonsentraation, jolloin kalsiumia virtaa koko ajan CNG-kanavasta sisään ja vaihtajasta ulos. Valostimuluksen seurauksena CNG-kanavia sulkeutuu ja kalsiumin sisäänvirtaus pienenee, mutta vaihtaja siirtää yhä kalsiumia ulos solusta. Tämä saa aikaan solunsisäisen kalsiumkonsentraation laskun valovasteen aikana. [4]

Näköaistinsolujen sisäjäsenessä sijaitsee kaliumia spesifisti läpäiseviä  **$\text{K}_x$ -kanavia**. Pimeässä kanavan läpi kulkee ulospäin suuntautuva kaliumionien  $\text{K}_x$ -virta, joka tasapainottaa CNG-kanavan läpi sisäänpäin suuntautuvaa kationivirtaa. Hyperpolarisaation seurauksena kaliumvirtaa ajava potentiaaliero pienenee, mikä pienentää  $\text{K}_x$ -virtaa. Hyperpolarisaatio myös sulkee  $\text{K}_x$ -kanavia. [4]

Näköaistinsolujen sisäjäsenessä sijaitsee myös hyperpolarisaation seurauksena avautuvia  **$\text{h}$ -kanavia**. Nämä kanavat ovat kiinni pimeässä ( $V_m = -35 \dots -40$  mV), mutta aukeavat solukalvon hyperpolarisoituessa. Kanavasta kulkee  $\text{Na}^+$ -ionit ja  $\text{K}^+$ -ionit. Hyperpolarisaation seurauksena  $\text{K}^+$ -virtaa ajava potentiaaliero pienenee, mutta  $\text{Na}^+$ -virtaa ajava potentiaaliero kasvaa. Kanavan käänteispotentiaali on  $-30$  mV, joten  $\text{Na}^+$ -ionit virtaavat avoimista kanavista soluun sisään ja syntyy solua depolarisoiva  $I_h$ -virta. [4] Tämä nopeuttaa kalvojännitteen palautumista normaalille tasolle valostimuluksen jälkeen [28].

Näköaistinsolun synaptisella alueella sijaitsee  **$\text{L}$ -tyypin kalsiumkanavia (engl. Long lasting)**, jotka avautuessaan pysyvät pitkään auki [25]. Nämä ovat jänniteherkkiä kanavia, jotka läpäisevät selektiivisesti  $\text{Ca}^{2+}$ -ioneja. Solun ollessa pimeätilassa soluun virtaa pieni kalsiumvirta  $I_{Ca}$ , joka saa aikaan glutamaatin vapautumista synapsirakoon. Kun solukalvo hyperpolarisoituu, kalsiumkanavia sulkeutuu, kalsiumin sisäänvirtaus synaptisella alueella pienenee ja glutamaatin vapautuminen synapsirakoon vähenee. Tämä toimii signaalina valovasteesta seuraaville hermosoluille. [4]  $\text{L}$ -tyypin  $\text{Ca}^{2+}$ -kanavien toimintaa voidaan manipuloida useiden ionien avulla. Esimerkiksi  $\text{Cd}^{2+}$ - ja  $\text{Co}^{2+}$ -ionien tiedetään salpaavan kanavia [29].

Synaptisella alueella on lisäksi jänniteherkkiä **kalsiumohjattuja kloridi- ja kaliumkanavia**. Molemmat kanavatyyppit avautuvat kalvojännitteen depolarisoituessa, mutta aktivaatio riippuu solunsisäisen vapaan kalsiumin pitoisuudesta. Kalium ja kloridi virtaavat kanavista solun ulkopuolelle, joten kloridivirta  $I_{Cl(Ca)}$  on soluun sisäänpäin ja kaliumionivirta  $I_{K(Ca)}$  solusta ulos. Solun hyperpolarisaatio sulkee  $\text{Ca}^{2+}$ -kanavia, joka johtaa  $\text{Ca}^{2+}$  sisäkonsentraation laskuun. Tämä sulkee kalsiumohjattuja kloridi- ja kaliumkanavia. [4]

**$\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPaasit** ovat ionigradientteja ylläpitäviä ionipumppuja, jotka sijaitsevat näköaistinsolujen sisäjäsenen alueella. Ionipumput pumppaavat soluun kaksi  $\text{K}^+$ -ionia ja solusta ulos kolme  $\text{Na}^+$ -ionia yhtä ATP-molekyyliä kohden. Pumpputyypin pitää epäsuorasti yllä solukalvon kalvojännitettä pitämällä yllä ionilajien konsentraatiogradientteja solukalvon yli. Tämä mahdollistaa pimeävirran muodostumisen. [4] Taulukkoon 2 on listattu tiivistelmä salamanterin näköaistinsolujen sisäjäsenen ionikanavista. Nisäkkäillä ionikanavat ovat samantyyppisiä.

Taulukko 2: Salamanterin näköaistinsolun sisäjäsenen ja synaptisen alueen ionivirtalähteitä. [29] [30]

Ionivirta	Ionilajit	Käänteispotentiaali [mV]	Salpaaajat	Aktivaatio [mV]
$I_h$	$Na^+, K^+$	-30	$Cs^+$	$< -50$
$I_{K_x}$	$K^+$	-75	$Ba^{2+}, TEA$	$> -60$
$I_{Ca}$	$Ca^{2+}$	50	$Cd^{2+}, Co^{2+}$	-40...50
$I_{K(Ca)}$	$K^+$	-75	IbTx, ChTx TEA	$Ca^{2+}, -30...40$
$I_{Cl(Ca)}$	$Cl^-$	-20...0	NifA, NPPB	$Ca^{2+}, -40...60$

### 3.3 Kalvovirrat näköaistinsoluissa

Valon absorptio muokkaa näköaistinsolujen ulkojäsenen kanavavirtoja, joka aiheuttaa solukalvon hyperpolarisaation. Hyperpolarisaation seurauksena monien kanavien ionivirrat muuttuvat joko ionivirtaa ajavan potentiaalineron tai kanavan läpäisevyyden muuttuessa. Kanavavirtojen muutokset aiheuttavat muutoksia myös soluvälitilan jänniteprofiilissa. Näitä muutoksia voidaan havainnoida ERG-tekniikalla, jota esitellään tarkemmin seuraavassa luvussa.

Oletetaan näköaistinsolut suljetuiksi systeemeiksi, joten kalvovirta ulos ja sisään on yhtä suuri. Tällöin kaikilla ajanhetkillä täytyy päteä

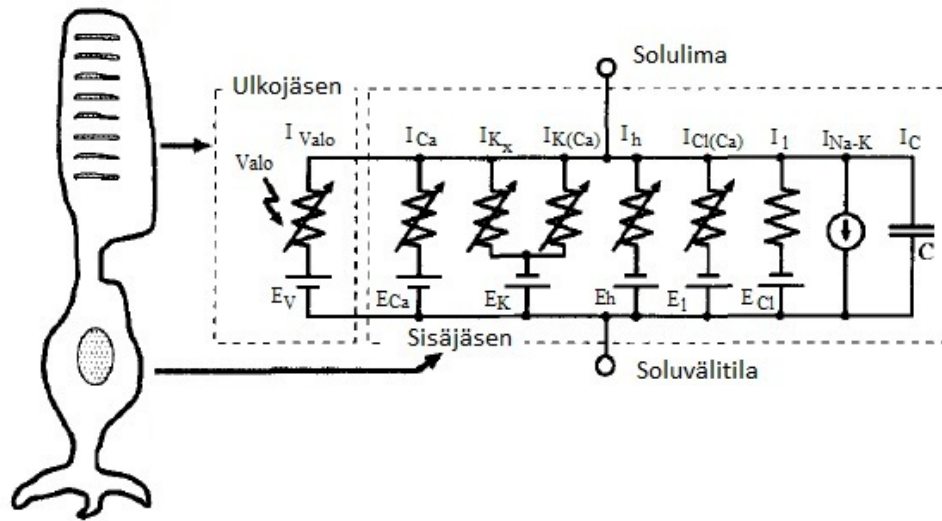
$$\Sigma I = I_{valo} + I_{K_x} + I_h + I_{Ca} + I_{Cl(Ca)} + I_{K(Ca)} + I_{Na-K} + I_l + C \frac{dV_m}{dt} = 0, \quad (18)$$

missä  $I_{valo}$  on ulkojäsenen CNG-kanavien ja  $Na^+/Ca^{2+}, K^+$ -vaihtajien läpi kulkeva virta,  $I_i$  kunkin kanavatyyppin kalvovirta,  $I_l$  muut vuotovirrat ja  $C \frac{dV_m}{dt}$  kapasitiivinen virta.

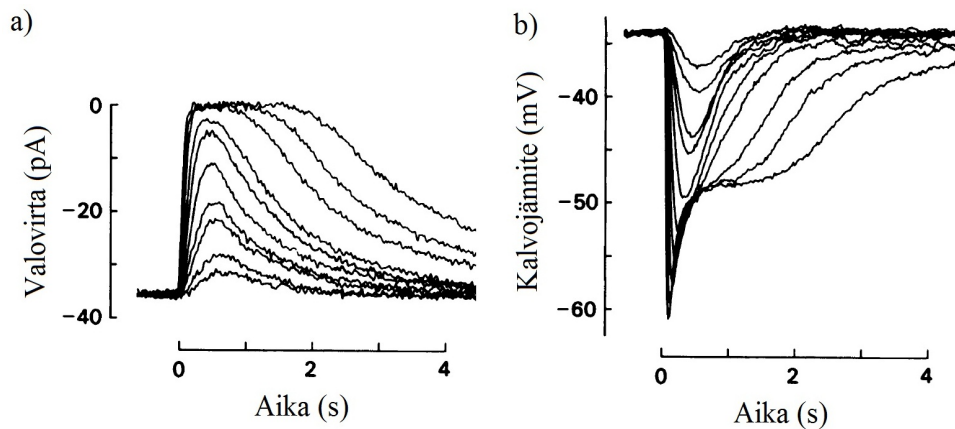
Näköaistinsolun solukalvon kalvovirtoja voidaan kuvata sähköisellä ekvivalenttipiirillä (kuva 9). Kanavavirtoja ajavia potentiaalieroja ( $V_m - V_{rev_i}$ ), jossa  $V_{rev_i}$  on kanavan käänteispotentiaali, kuvataan jännitelähteillä. Kalvon konduktiivisuuksia kuvataan säädettävänä vastuksina, kalvopumppuja virtalähteinä ja kalvon kapasitanssia kondensaattorina. Kanavavirta määräytyy kuten yhtälössä (14) solun kalvojännitteestä, kanavan konduktanssista ja kanavan käänteispotentiaalista.

#### Kalvovirran ja -jänniteen muodostuminen näköaistinsoluissa

Valostimuluksen jälkeen ulkojäsenen valoherkkiä CNG-kanavia sulkeutuu nopeasti ja ulkojäsenvirta pienenee (kuva 10 a). Valoherkkien kanavien sulkeutuminen saa aikaan solukalvon hyperpolarisaation, koska solukalvon läpäisevyys natriumille pienenee ja kalvojännite muuttuu nopeasti kohti kaliumin Nernstin potentiaalia. Tämä pienentää kaliumvirran ajavaa voimaa, jolloin  $K_x$ -kanavavirta pienenee.  $K_x$ -kanavia



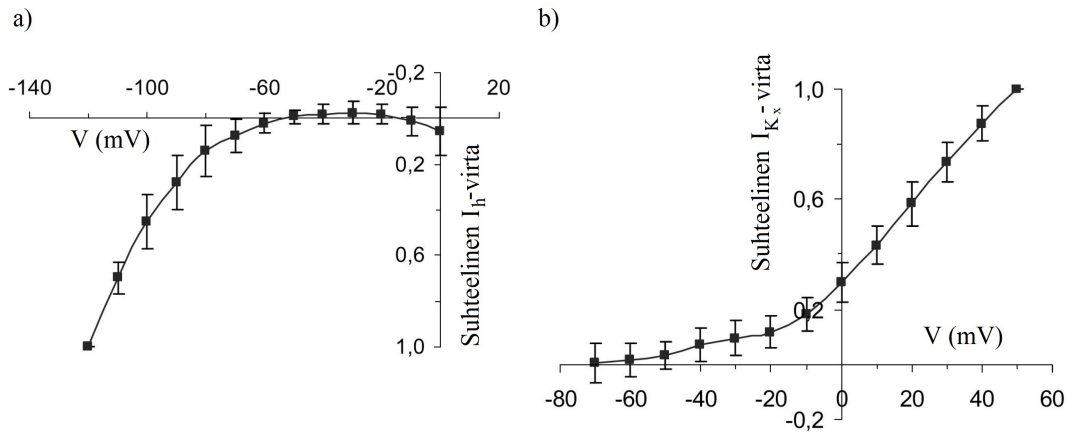
Kuva 9: Näköaistinsolujen kalvovirtoja kuvaava ekvivalenttipiiri. Kanavavirtoja voidaan kuvata rinnankytkettyjen säädettävien resistanssien ja jännitelähteiden avulla. [30], muokattu



Kuva 10: Salamanterin valovasteet 20 °C lämpötilassa 11 ms valostimuluksilla. Valon voimakkuutta on kasvatettu n. kaksinkertaiseksi vasteiden välillä. a) Valovirtavaste eli ulkojäsenen kanavien virran muutos pimeätilasta valon absorption seurauksena. b) Kalvojännitteen muutos valon absorption seurauksena pimeätilasta eli jännitevalovaste. [31], muokattu

myös sulkeutuu hyperpolarisaation seurauksena. Solukalvon hyperpolarisaatio avaa viipeellä jänniteohjattuja  $h$ -kanavia, mikä saa aikaan natriumin sisäänvirtauksen ( $I_h$ ). Kasvanut natriumin sisäänvirtaus depolarisoi solukalvoa ja nopeuttaa solun palautumista pimeätilaan [28]. Hyperpolarisaatio ja  $I_h$ -virran vaikutus nähdään voimakkailla valostimuluksilla kuvassa 10 b kalvojännitteen nopeana laskuna, jonka jälkeen kalvojännite nousee hetkellisesti stationääritilaan ennen kuin fototransduk-

tiokaskadin deaktivaation seurauksena solukalvon virrat ja jännitte palautuu pimeätilaan. Nisäkkään h-kanavavirta ja  $K_x$ -kanavavirta kalvojännitteen funktiona on esitetty kuvassa 11.



Kuva 11: Sian sauvasolujen a) h-kanavavirta ja b)  $K_x$ -kanavavirta kalvojännitteen funktiona. h-kanavat aukeavat  $K_x$ -kanavavirta pienenee kalvon hyperpolarisoituessa. h-kanavavirta on saatu tekemällä jännitelukitus ensin normaalissa elatusaineessa ja lisätty tämän jälkeen 5 mM  $Cs^+$ , joka salpaa h-kanavat. Tämän jälkeen h-kanavavirta on laskettu näiden erotuksena.  $K_x$ -virta on saatu samoin käyttämällä 30 mM  $K_x$ -kanavat salpaavaa TEA:a. Mittaukset tehty valoisassa. [32], muokattu

Baumann ym. tutkivat L-tyypin kalsiumvirtaa ekspressoimalla hiiren L-tyypin kalsiumkanavan kanavaproteiinia HEK293-soluihin (ei näköaistinsolu) ja mittaamalla patch-clamp tekniikalla kanavavirtaa. Kanavan läpäisevyys oli hyvin pieni fysiologisella jännitealueella eikä virta kasvanut merkittävästi hyperpolarisaation aiheuttaman kalsiumvirtaa ajanvan potentiaalieron kasvaessa [33]. Kanavan ominaisuudet voivat kuitenkin olla erilaiset kuin fysiologisessa tilanteessa, koska rekisteröintejä ei tehty kanavan luonnollisessa ympäristössä. Cia ym. kokeissa sian  $I_{Ca}$  käyttäytyi valossa eri tavalla Bayman ym. tuloksiin nähden. Fysiologisilla kalvojännitteillä  $I_{Ca}$  on valoissa tehdyissä mittauksissa hyvinkin merkittävä ja se voi toimia kalvojännitteen moduloivana virtana. Varmojen tulosten saamiseksi kalsiumkanavavirta tulisi karakterisoida myös pimeässä.

Muita kalvojännitettä mahdollisesti moduloivia kalvovirtoja ovat kalsiumohjattujen kalium- ja kloridikanavavirrat. Niiden läpäisevyys on kuitenkin fysiologisilla kalvojännitteillä pieni ja lisäksi valovasteen aikana näköaistinsolujen sisäinen kalsiumpitoisuus laskee, jolloin kanavien läpäisevyys laskee. [34], [35] Suurilla valostimuluksen voimakkuuksilla myös kapasitiivinen kalvovirta voi muokata jännitevalovasteita. Kapasitiivinen virta näkyisi vasteissa nopeina transientteina aaltolina.

## 4 ERG-signaali

Elektroretinografia (ERG) on tekniikka, jolla mitataan verkkokalvossa syntyviä kenttäpotentiaaleja. Nämä kenttäpotentiaalit syntyvät näköaistinsolujen absorboidessa fotoneja, minkä seurauksena verkkokalvon soluvälitilan virtojen muutokset aiheuttavat jännitemuutoksia verkkokalvossa. ERG-signaali on yksi ensimmäisistä elävästä kudoksesta mitatuista potentiaaleista. Muita tutumpia kenttäpotentiaalimittauksia ovat sydänsähkökäyrää mittaava elektrokardiografia (EKG) ja kallon päältä aivosähkökäyrää mittaava elektroenkefalografia (EEG) [17].

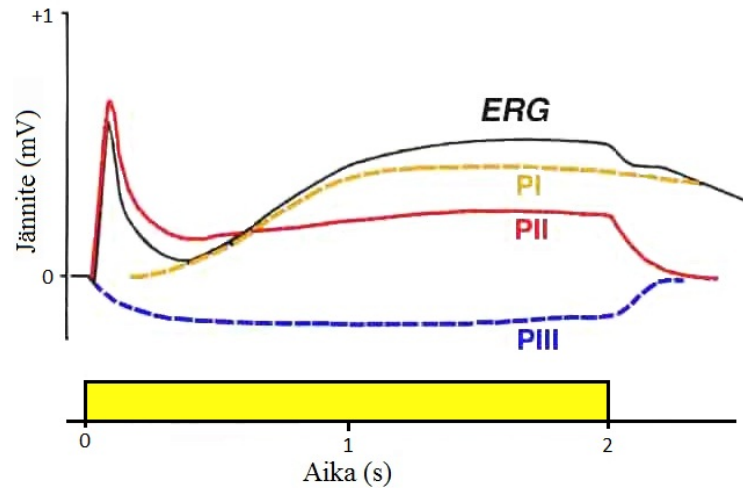
ERG-signaalia voidaan rekisteröidä kliinisesti ihmisiltä, ja sitä käytetään yleisesti silmäsairauksien diagnosointiin. Ihmisen tai nukutetun eläimen ERG-signaalia rekisteröidään silmän pinnalta piilolinssielektrodilla (*in vivo* -ERG). Lisäksi ERG-signaalia voidaan rekisteröidä eläimestä eristetyistä verkkokalvosta. Koko verkkokalvon yli tapahtuvaa rekisteröintiä kutsutaan transretinaali-ERG:ksi (TERG) ja mikroelektrodeilla tietystä kohdasta tehtävää rekisteröintiä kutsutaan lokaali-ERG:ksi (LERG).

ERG-signaalin suuruusluokka on lajista ja mittausgeometriasta riippuen mikrovoltteista millivoltteihin ja sen tuottamiseen osallistuvat useat verkkokalvon solutyypit [17]. Tässä luvussa käsitellään ERG-signaalin eri komponentteja, näköaistinsolujen ERG-signaalin farmakologista erottamista sekä sen rekisteröimistä TERG- ja LERG-tekniikoilla.

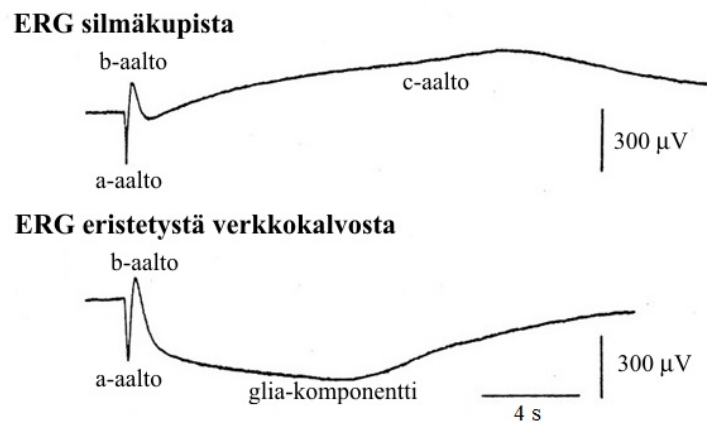
### 4.1 ERG-signaalin komponentit

ERG-vasteiden komponenttien luokittelussa käytetään yleisesti kahta eri tapaa. Granit tutki signaalin komponentteja kissan silmästä anestesian avulla jo 1930-luvulla. Syventämällä kissan anestesiaa vähitellen saatiin ERG-vasteista erotettua kolme komponenttia: PI, PII ja PIII [36]. PI-komponentti oli suuri hidas positiivinen komponentti. PII-komponentti koostui nopeasta suuresta positiivisesta aallosta sekä hitaammasta tasaisesta positiivisesta aallosta. PIII-komponentti oli kahta muuta pienempi negatiivinen komponentti, joka ERG-vasteissa peittyi PII ja PIII-komponenttien alle. Granitin mittauksissa PI-komponentti hävisi anestesiaa syvennettäessä ensimmäisenä, PII-komponentti toisena ja PIII-komponentti viimeisenä. Granitin ERG-komponenttien luokittelu on esitetty kuvassa 12.

Toinen tapa ERG-signaalin luokitteluun on erotella siinä selvästi havaittavat aalto-muodot. Näin ERG-signaali saadaan jaettua neljään aaltoon, jotka vastaavat hyvin myös Granitin komponenttianalyysia: Signaalissa ensimmäisenä havaittava a-aalto vastaa PIII-komponentin alkuosaa tai tarkemmin nopean PIII-komponentin alkuosaa, b-aalto PII-komponenttia ja c-aalto PI-komponenttia. Glia-komponentti vastaa PIII-komponentin loppuosaa. Muita tutkittuja ERG-komponentteja ovat muun muassa oskillaattoriset potentiaalit (OPs) ja ns. nenäkomponentti. Eri komponentteja on esitetty kuvassa 13.



Kuva 12: Kissan silmästä mitattu ERG-vaste 2 s valostimulukseen. Kuvassa on nähtävillä PI-, PII- ja PIII-komponentit, jotka on saatu eroteltua kissan anestesian syvyyttä lisäämällä. [37], muokattu



Kuva 13: Rauskun silmäkupista ja eristetyistä verkkokalvosta mitatut ERG-vasteet 4 s valostimuluksella. Silmäkupista mitatussa vasteessa on näkyvissä a-, b- ja c-aallot ja eristetyssä verkkokalvossa a- ja b-aallot sekä glia-komponentti. Eristetyn verkkokalvon ERG-vasteessa ei ole c-aaltoa, koska pigmenttiepiteeli on irrotettu verkkokalvosta. [38], muokattu

Pimeäadaptoituneet näköaistinsolut synnyttävät valostimuluksen seurauksena ERG-signaalin a-aallon. Kun verkkokalvon distaalinen puoli valitaan jännitteen nollatasoksi, a-aalto on polariteetiltaan negatiivinen. Myöhemmät komponentit ovat seurausta verkkokalvon muiden solujen sähköisestä toiminnasta. b-aallon oletetaan nykytiedon mukaan syntyvän pääasiassa toisen kertaluvun hermosolujen, ON-tyyppisten bipolaarisolujen, aktivaation seurauksena. b-aalto on tehdyn merkivalinnan perusteella polariteetiltaan positiivinen suuri komponentti, joka peittää osaksi a-aallon alleen. b-aalto on a-aaltoon nähden hieman viivästynyt.

Glia-komponentti on verkkokalvossa sijaitsevien gliasolujen, Müllerin solujen, tuottama hidas negatiivinen aalto, joka osuu osaksi päällekkäin a-aallon kanssa. c-aalto on pigmenttiepiteelin tuottama hidas ja suuri positiivinen aalto. c-aaltoa ei voida nähdä eristetyn verkkokalvon kokeissa, koska pigmenttiepiteeli on irrotettu verkkokalvosta.

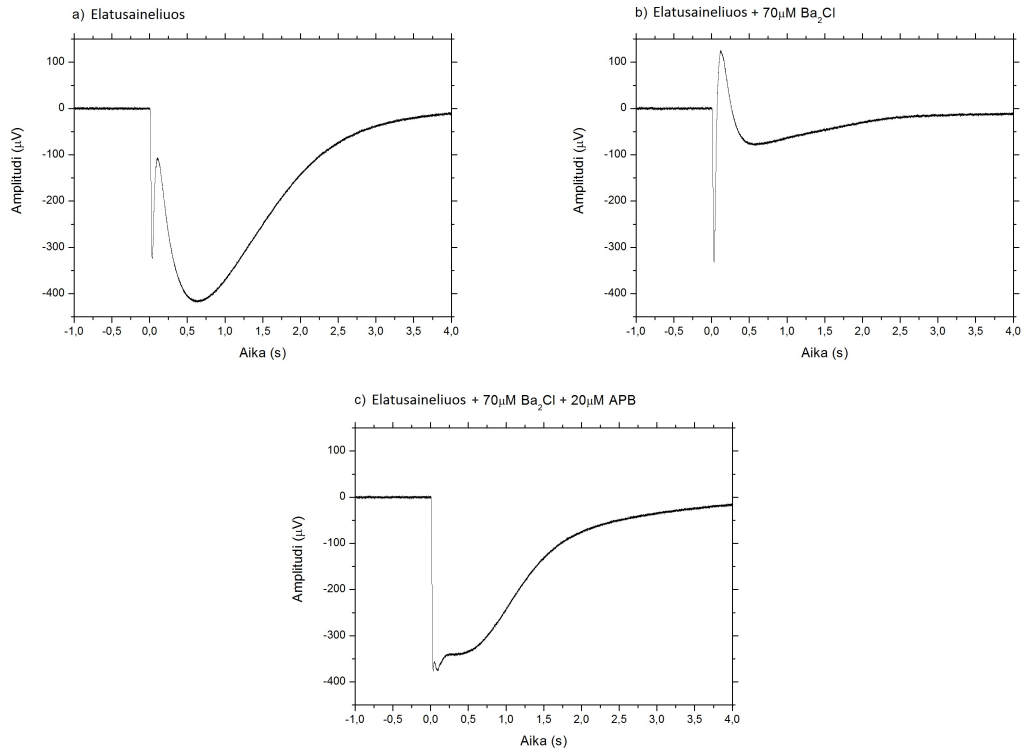
## 4.2 Näköaistinsolujen ERG-vasteen erottaminen farmakologisesti

Usein halutaan tutkia näköaistinsolujen tuottamaa valovastetta, joka peittyy suurelta osin ylemmän kertaluokan hermosolujen tuottamien vasteiden (mm. b-aalto) alle. Yksittäisten solutyypin tuottamien vasteiden erottamiseksi muiden solutyypin signaalivälitys pitää estää. Eristetyllä verkkokalvolla tehdyissä kokeissa näköaistinsolujen tuottaman ERG-vasteen erottamiseen käytetään useimmiten farmakologiaa.

Jotta voitaisiin rekisteröidä ainoastaan näköaistinsolujen vastetta, on signaalin välitys näköaistinsoluista katkaistava. Estämällä glutamaatin sitoutuminen postsynaptisiin glutamaattireseptoreihin eivät valon tuottamat muutokset enää välity bipolaarisoluille eikä näin ollen muuhunkaan verkkokalvoon. Tämä saadaan toteutettua lisäämällä perfuusioliokseen glutamaattireseptoriagonistia tai -antagonistia. Glutamaattireseptoriagonistit kiinnittyvät postsynaptisiin glutamaattireseptoreihin, joten glutamaattipitoisuuden muutokset eivät pysty moduloimaan postsynaptista hermopäätettä. [39] Eräs tällainen aine on aspartaatti. Jos halutaan katkaista ainoastaan yhteys ON-bipolaarisoluihin, voidaan käyttää ON-bipolaarisolujen postsynaptisiin glutamaattireseptoreihin selektiivisesti kiinnittyvää L- 2-amino-4-fosfonobutyriihappoa (APB) [40]. APB:sta on olemassa myös raseeminen DL-seos, jossa toimii antagonistina OFF-bipolaarisolujen reseptoreissa. Lisäksi cis-2,3-piperidiinidikarboksyliihappoa (PDA) voidaan käyttää estämään signaalivälitys OFF-bipolaarisoluihin [41].

Verkkokalvon tukisolujen, Müllerin solujen, tuottama glia-komponentti peittää alleen näköaistinsolujen valovasteen paluuvaiheen. Valovasteen aikana näköaistinsolujen soluvälitilan  $K^+$ -ionipitoisuus laskee. Müllerin solujen  $K^+$ -kanavavirta tasapainottaa tätä muutosta, jolloin ERG-vasteeseen muodostuu lähes koko verkkokalvon läpi ulottuvien Müllerin solujen  $K^+$ -ionivirtojen aiheuttama glia-komponentti. Komponentti voidaan poistaa salpaamalla Müllerin solujen  $K^+$ -kanavat bariumin avulla. Barium salpaa myös näköaistinsolujen sisäjäsenten  $K^+$ -kanavia, mutta vasta suuremmilla pitoisuuksilla kuin Müllerin solujen kanavia. Siten sopivalla  $Ba^{2+}$ -pitoisuudella voidaan hävittää glia-komponentti vaikuttamatta merkittävästi näköaistinsolujen valovasteeseen. [42] Eri komponenttien poistamista ERG-signaalista on esitetty kuvassa 14.

Näköaistinsolujen tuottama ERG-komponentti on summa-aalto sauvasolujen ja tappisolujen vasteista. Tappisolut toimivat huomattavasti voimakkaammalla valon intensiteeteillä kuin sauvasolut. Tappisolut myös palautuvat kirkkaista stimuluksista sauvasoluja nopeammin. Tappisolujen vaste voidaan erottaa käyttämällä kirkasta



Kuva 14: ERG-signaalin komponenttien erottaminen farmakologisin keinoin. Vasteessa a) on käytetty tavanomaista elatusaineliuosta, johon ei ole lisätty muita aineita. Vasteesta voidaan erottaa ensin negatiivinen a-aalto, sitä seuraava positiivinen b-aalto sekä viimeiseksi hidas negatiivinen glia-komponentti. Vasteessa b) on lisätty 70  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$ , mikä hävittää vasteesta glia-komponentin. Vasteessa c) on lisätty lisäksi 20  $\mu\text{M}$  DL-APB, mikä estää signaalin välittymisen näköaistinsoluilta bipolaarisoluille ja lopputuloksena saadaan erotettua pelkästään näköaistinsolujen tuottama vaste. Valostimuluksen pituus oli 2 ms.

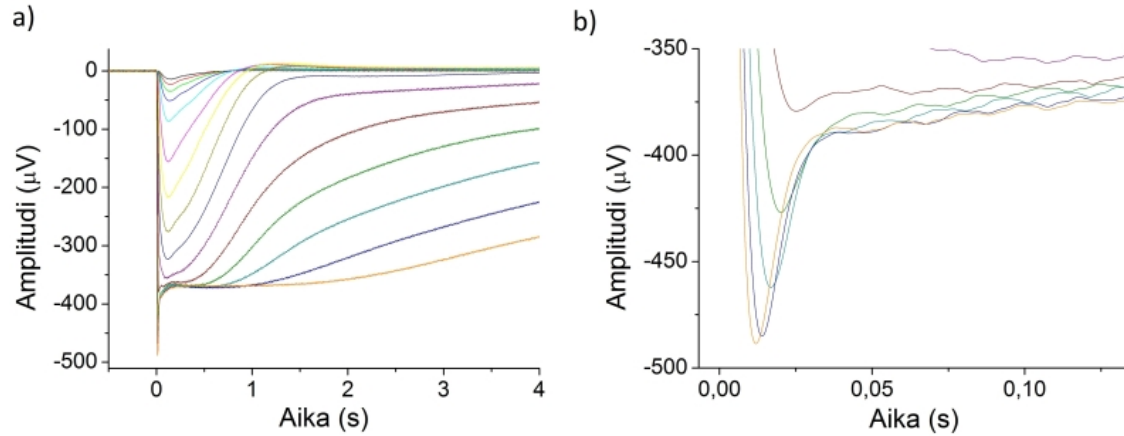
esistimulusta saturoimaan sauvasolut, jolloin seuraava stimulus stimuloi vain tappisoluja. Tappivasteet voidaan myös erotella saturoimalla sauvasolut jatkuvan taustavalon avulla, mutta tällöin tappivasteet ovat valoadaptoituneita.

Näköaistinsolujen ERG-vasteisiin muodostuu voimakkailla valostimuluksilla nopea transientti aalto, jota kutsutaan myös nenäkomponentiksi. Toisin kuin valovirtavaste, joka saturoituu voimakkailla valostimuluksilla kaikkien CNG-kanavien sulkeutuessa, nenäkomponentti kasvaa vielä tätä suuremmilla valostimuluksen voimakkuuksilla. Vinberg ym. ovat esittäneet nenäkomponentin syntyvän valostimuluksen aiheuttamasta sisäjäsenten jänniteherkkien kanavien aiheuttamasta kalvojännitemodulaatiosta [43].

Kuvassa 15 a on esitetty farmakologisesti erotettu näköaistinsolujen TERG-vasteperhe. Vasteperheeseen on kerätty ERG-vasteita eri valostimuluksen voimakkuuksilla. Kuvassa 15 b nähdään tarkemmin nopea transientti nenäkomponentti, joka kasvaa valostimuluksen voimakkuuden kasvaessa. Nenäkomponentin jälkeen vasteet palaa-



vat samalle tasolle. On edelleen avoin kysymys, vastaako tämä ERG-vasteperheissä nähtävä taso valovirtavasteiden saturaatiotasoa, jossa kaikki CNG-kanavat ovat sulkeutuneet, koska sisäjäsenen kanavavirrat voivat muokata tasoa. Jännitevalovasteessa solukalvon hyperpolarisoituessa h-kanavat depolarisoivat solukalvoa, jolloin saturaatiotason asettaa pääasiassa h-kanavien ja kaliumkanavien määräämä stationääritila. Sama voi tapahtua myös ERG-vasteissa, jos h-kanavat tai kaliumkanavat ovat epätasaisesti jakautuneena sisäjäsenen solukalvolla. Myös L-tyypin kalsiumkanavavirta voi mahdollisesti muokata vasteiden aikakäyttäytymistä.



Kuva 15: a) Farmakologisesti erotettu hiiren sauvasolujen ERG-vasteperhe. Vasteita on kerätty eri valostimuluksen voimakkuuksilla (kesto 2 ms) siten, että saadaan kartoitettua lähes koko näköaistinsolun toiminnallinen alue. b) Saman vasteperheen nenäkomponentit tarkennettuna. Nenäkomponentin nähdään kasvavan valon voimakkuuden kasvaessa, mutta saturaatiotaso pysyy ennallaan. Elatusaineliuokseen on lisätty 50  $\mu M$  APB ja 50  $\mu M$  BaCl<sub>2</sub>. Vasteet on rekisteröinyt Marja Pitkänen TERG-tekniikalla.

### 4.3 Transretinaali-ERG (TERG)

Transretinaali-ERG:llä tarkoitetaan mittaustekniikkaa, jossa verkkokalvossa kiertävien virtojen synnyttämiä kenttäpotentiaaleja rekisteröidään verkkokalvon yli. Tämä tapahtuu sijoittamalla kaksi makroskooppista mittauselektrodia verkkokalvon eri puolille siten, että niillä on sähköinen yhteys toisiinsa ainoastaan verkkokalvon läpi. TERG-tekniikassa kunkin verkkokalvon solutyypin aiheuttamat vasteet ”keskiarvoistuvat” signaalissa, koska solut ovat järjestyneet verkkokalvossa yhdensuuntaiseksi kerrosmaiseksi rakenteeksi. Suuresta ”keskiarvostuksesta” johtuen TERG-tekniikalla rekisteröityjen vasteiden välinen vaihtelu on pientä.

Pimeäadaptoituneen verkkokalvon solujen kalvovirrat jakavat soluvälitilan varauksia varausjakaumaan, jossa ei tapahdu keskimääräistä varauksensiirtoa, mikä näkyy potentiaalierona mittauselektronikalle. Tätä jännitetasoa käytetään TERG-mittauksissa referenssitasona, johon valon aikaansaamia muutoksia verrataan. Valos-

timulus sulkee ulkojäsenen CNG-kanavia ja pienentää näin näköaistinsoluissa kiertävää pimeävirtaa. Tämä näkyy muutoksena ionien varausjakaumassa ja pienentää mittaaselektrodien välistä potentiaaliero.

Näköaistinsolujen ionikanavat muodostavat näköaistinsolukerrokseen useita virtanieluja ja -lähteitä, joiden jakauma muuttuu valossa. Suurin osa soluvälitilassa kiertävistä virroista on näköaistinsolujen pituussuuntaisia. Poikittaiset virrat ovat alle 5 % pitkittäisistä virroista. [9] Olettamalla näköaistinsolut suljetuksi virtapiiriksi saadaan virran muutokselle ja kalvon läpäisevälle virralle Kirchhoffin virtalain avulla yksinkertainen yhteys

$$I_o(z, t) + K_m(z, t)\Delta z = I_o(z + \Delta z, t), \quad (19)$$

missä  $I_o(z, t)$  kuvaa paikasta ja ajasta riippuvaa soluvälitilan virtaa ja  $K_m(z, t)$  solukalvon läpäisevää virrantiheyttä. Sama voidaan ilmaista myös derivaatan avulla [25]

$$\frac{dI_o}{dz} = K_m(z, t). \quad (20)$$

Ionivirtojen kulkiessa resistiivisessä soluvälitilassa syntyy jännitehäviöitä, jotka muodostavat ERG-tekniikassa rekisteröitävän signaalin. Jännitehäviön laskemiseksi tarvitaan tietoa virtalähteiden ja -nielujen sekä soluvälitilan resistiivisyysjakaumasta. Jakaumien avulla näköaistinsolujen ERG-signaali voidaan laskea integraalia

$$\Delta V(z, t) = \int r(z, t)I_o(z, t)dz \quad (21)$$

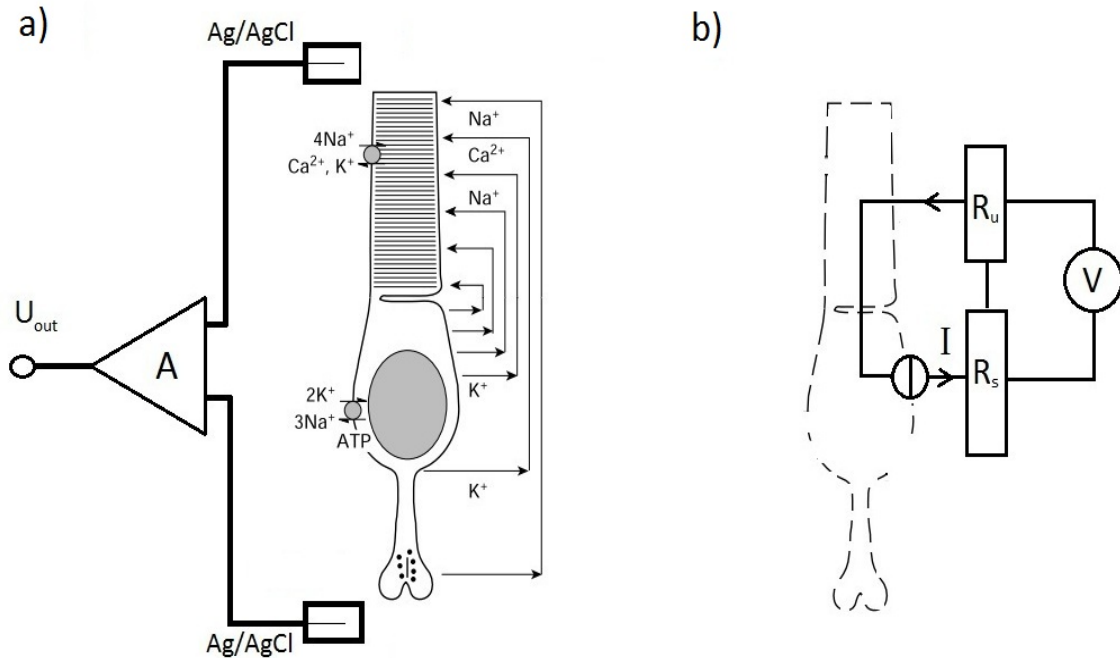
käyttäen, missä  $r(z, t)$  on resistanssi pituusyksikköä kohden ja  $I_o(z, t)$  on virta soluvälitilassa. Integrointi tapahtuu koko verkkokalvon tai sen kerroksen yli, josta ERG-signaali halutaan laskea.

Yhtälöä (21) voidaan yksinkertaistaa näköaistinsoluille tietyin oletuksin. Pugh ym. käyttivät oletuksena, että sauvasolujen soluvälitilan resistanssi koostuu kahdesta osasta: sisäjäsenkerroksen ja ulkojäsenkerroksen soluvälitilan resistanssista. Lisäksi sisäjäsenessä oletetaan olevan virtalähteitä ja ulkojäsenessä virtanieluja tasaisin välein. Tällöin virta on maksimissaan ciliumin kohdalla, ja se laskee lineaarisesti maksimikohdasta nollaan näköaistinsolujen päitä lähestyttyä. Keskimäärin puolet maksimivirrasta siis kulkee molempien resistanssien läpi. Yhtälö (21) supistuu näillä yksinkertaistuksilla muotoon

$$\Delta V = I_{max}\left(\frac{R_u}{2} + \frac{R_s}{2}\right), \quad (22)$$

missä  $I_{max}$  on maksimivirta,  $R_u$  ulkojäsenen soluvälitilan resistanssi ja  $R_s$  sisäjäsenen soluvälitilan resistanssi. [44] Transretinaali-ERG-mittausta ja Pugh ym. käyttämää oletusta on havainnollistettu kuvassa 16 virtapiirianalogialla. Tällainen yksin-

kertaistus ei kuitenkaan ota huomioon sisäjäsenen alueella kiertäviä virtoja tai sisäjäsenen solukalvon jänniteherkkien kanavien toimintaa. Se toimii karkeana mallina mietittäessä valovirran syntymekanismeja.



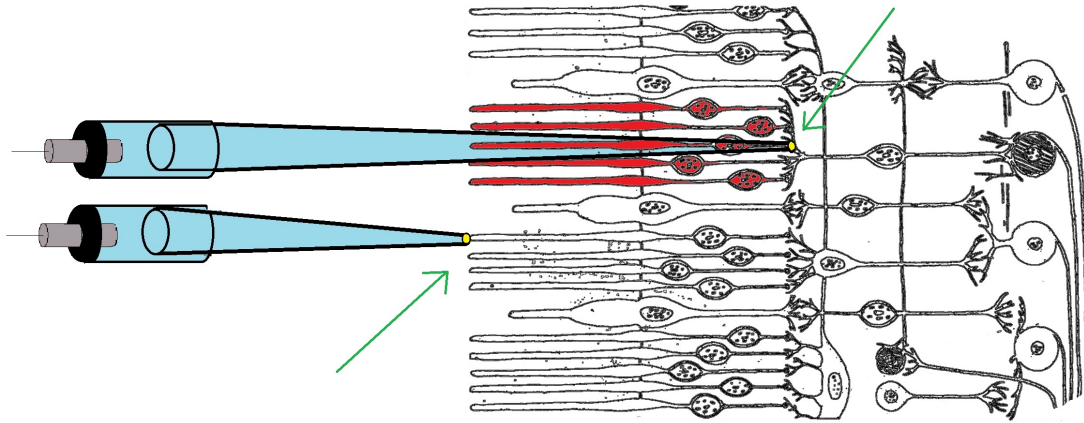
Kuva 16: TERG-mittauksen periaate yksinkertaistettuna virtapiirianalogiana. a) Solukalvon pumppujen ylläpitämät ionigradientit toimivat lähteenä ionivirralle. Soluvälitilan resistanssi saa aikaan jännitehäviön, joka voidaan mitata mittauselektrodeilla. b) Yksinkertaistuksessa soluvälitilan resistanssi jaetaan kahteen vakiokomponenttiin: sisäjäsenkerroksen ( $R_s$ ) ja ulkojäsenkerroksen ( $R_u$ ) resistansseihin. Soluvälitilassa kiertävän virran oletetaan muuttuvan lineaarisesti siten, että maksimivirta on ciliumin kohdalla. [44]

#### 4.4 Lokaali-ERG (LERG)

Lokaali-ERG:llä tarkoitetaan mittaustekniikkaa, jossa ERG-signaalia rekisteröidään rajatulta alueelta, esimerkiksi tietyistä verkkokalvon kerroksesta. LERG-tekniikkaa voidaan käyttää soluvälitilan resistiivisyysprofiilien selvittämiseen ja virtanielujen ja -lähteiden sekä signaalikomponenttien paikallistamiseen.

Tekniikka on hyvin samanlainen kuin TERG, mutta makroelektrodien sijaan käytetään vähintään yhtä mikroelektrodia. Mikroelektrodina käytetään ohutta pipettiä, jonka kärjen halkaisija on yhdestä muutamaan mikrometriin. Pipetti työnnetään verkkokalvon sisään haluttuun kerrokseen. Tämän jälkeen vastaelektrodina voidaan käyttää makroelektrodia tai toista mikroelektrodia, joka sijoitetaan niin, että rekisteröinti voidaan suorittaa halutusta verkkokalvon osasta. Esimerkiksi ulkojäsenkerroksen signaaleja rekisteröitäessä mikroelektrodi voidaan työntää ulkojäsenker-

roksen läpi ciliumiin asti ja vastaelektrodi voidaan jättää verkkokalvon distaaliselle puolelle nestekontaktiin ulkojäsenten kanssa. Kuvassa 17 on havainnollistettu mit-tauselektrodien sijoittelua LERG-mittauksissa.



Kuva 17: LERG:n mittausasettelu. Kuvassa verkkokalvo ja mittauksessa käytettävät mikroelektrodit. Lokaalimittauksissa rekisteröidään vain paikallisen soluryhmän synnyttämiä vasteita. Rekiseröitävään signaaliin voimakkaimmin vaikuttavat solut on merkitty punaisella. Kuvassa rekisteröinti tehdään verkkokalvon näköaistinsolujen puoleisen pintakerroksen ja niiden synaptisen alueen väliltä.

## 5 Laitteisto TERG- ja LERG-signaalien samanaikaiseen rekisteröintiin

Diplomityön tarkoituksena oli kehittää laitteisto ERG-signaalin rekisteröimiseen samanaikaisesti näköaistinsolukerroksen sekä koko verkkokalvon yli. Laitteiston kehitykseen kuului LERG- ja TERG-tekniikoiden yhdistämiseen sopivan näytepitimen suunnittelu ja toteutus, elatusainevirtauksen ja lämmityksen mahdollistaminen, mikromanipulaatiojärjestelmä, valostimulusjärjestelmä, signaalinvahvistus sekä datankeruu. Tässä luvussa esitellään kehitetty laitteisto ja käsitellään yksitellen kutakin laitteiston osa-aluetta.

### 5.1 Ratkaisut laitteiston suunnittelussa ja toteutuksessa yleisesti

Sekä LERG- että TERG-tekniikoissa preparaattina on eristetty verkkokalvo. Se alue verkkokalvosta, jolta mitattava signaali syntyy, on pidettävä mahdollisimman fysiologisissa olosuhteissa sekä mekaanisesti kuormittamattomana. Tätä varten suunniteltiin avonainen näytepidinratkaisu, jossa lämmitetty fysiologinen elatusaineliuosvirtaus huuhtelee verkkokalvon pintaa.

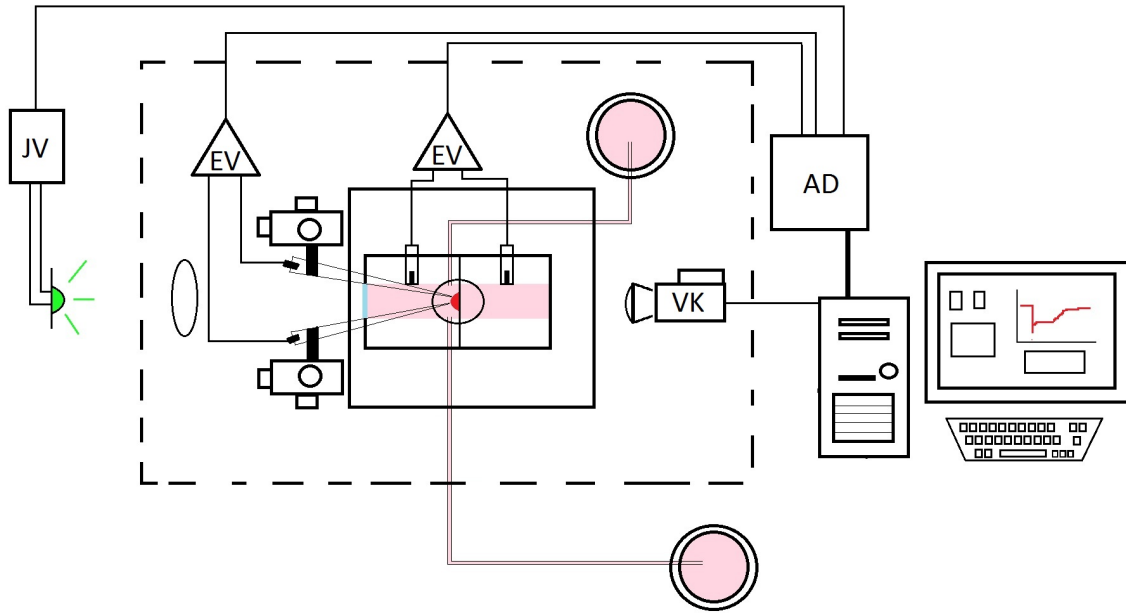
Pimeäadaptoitua verkkokalvoa stimuloidaan kontrolloiduilla valostimuluksilla. Laitteiston valostimulusjärjestelmässä päätettiin käyttää tehokkaita LEDejä, joiden valostimulusten kestoja ja voimakkuutta voidaan säätää tietokoneelta. Valostimulus ohjataan verkkokalvolle valokuidun sekä optiikan avulla siten, että se on homogeeninen verkkokalvolla.

LERG-signaalia mitataan kahdella mikroelektrodilla, joita voidaan liikuttaa kolmessa dimensiossa mikromanipulaattoreiden avulla. TERG-signaalia rekisteröidään verkkokalvon molemmiin puoliin asetetuilla makroelektrodeilla. Mitatut signaalit vahvistetaan ensin esivahvistimilla ja suodatetaan kaupallisella 8-napaisella Besselin suotimella (Frequency devices<sup>TM</sup>, inc. 950 tunable active filter), jonka jälkeen signaali digitalisoidaan ja tallennetaan tietokoneelle.

Sähköisten häiriöiden suojaamiseksi koko laitteisto rakennettiin Faradayn häkin sisään. Kaikki häkin sisään viedyt mahdolliset häiriölähteet kuten sähköjohdot sekä nestevirtausletkut on maadoitettu erikseen signaalimaahan. Mekaanisten häiriöiden välttämiseksi laitteisto on sijoitettu värinävaimennetulle pöydälle. Laitteisto on esitelty kaavamaisesti kuvassa 18.

### 5.2 Näytepidin

Näytepitimen tarkoitus on luoda mekaaninen tuki verkkokalvolle sekä mahdollistaa fysiologisen kaltaisten olosuhteiden ylläpito verkkokalvon läheisyydessä. Lisäksi näytepitimessä tulee olla esteetön reitti valostimulukselle sekä mittaaselektrodeille ja mahdollisuus seurata verkkokalvon tilaa mikroskooppiin kytketyn videokä-

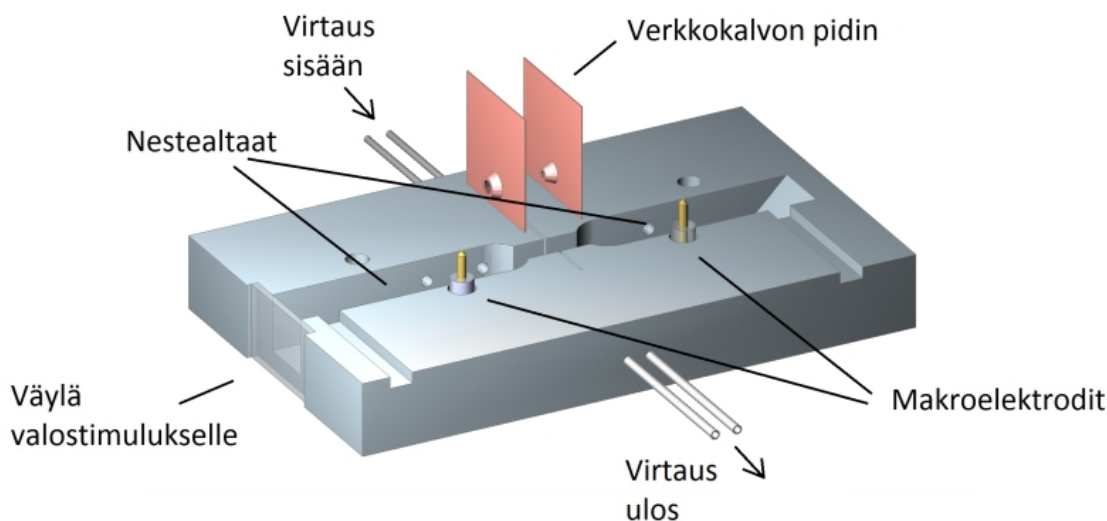


Kuva 18: Kaavakuva kehitetystä laitteistosta. Kuvan keskellä olevaan näytepitimeen on asetettu verkkokalvo (punainen). Näytepidin on asennettu mikroskoopin näytepöydälle ja verkkokalvon tilaa voidaan monitoroida mikroskooppiin kytketyn videokameran (VK) avulla. Lämmitetty elatusliuosvirtaus (vaaleanpunainen) huuhtelee verkkokalvon pintaa mahdollistaen fysiologisen kaltaiset olosuhteet. Verkkokalvoa stimuloidaan LEDillä, jota ohjataan tietokoneeseen kytketyllä jännite-virta-muuntimella (JV). ERG-signaali mitataan makro- sekä mikroelettrodeilla ja se vahvistetaan esivahvistimilla (EV). Signaali AD-muunnetaan datankeruukortilla (AD) ja tallennetaan tietokoneelle. Laitteisto on häiriöiden minimoimiseksi rakennettu hajavalolta suojaavaan Faradayn häkkiin tärinävaimennetulle pöydälle (katkoviiva).

meran avulla. Nämä vaatimukset täyttävä näytepidin suunniteltiin Autocad 2010-ohjelmalla, ja se työstettiin Aalto-yliopiston Perustieteiden korkeakoulun verstaalla polykarbonaatista. Näytepidin on esitetty kuvassa 19.

Verkkokalvo asetetaan pitimeen, joka koostuu kahdesta biologisesti inertistä polystyreenilevyistä. Toisessa levyssä on verkkokalvolle sopivaksi muotoiltu koroke ja toisessa korokkeeseen sovitettu vastinosa. Verkkokalvo asetetaan levyjen väliin siten, että verkkokalvo puristuu reunoilta tiukasti paikoilleen. Keskellä koroketta on tehollisen mittausalueen määrittävä  $\varnothing 1$  mm pyöreä aukko. Vastinlevyssä on mittausalueen kohdalla hieman tätä suurempi aukko.

Verkkokalvon pitimen tarkoituksena on tarjota verkkokalvolle mahdollisimman hyvä tuki, jossa verkkokalvo ei pääse liikkumaan eikä siihen kohdistu mekaanista rasitusta. Pidin myös eristää näytepitimen nestealtaat sähköisesti toisistaan siten, että sähköinen yhteys on ainoastaan verkkokalvon läpi. Verkkokalvolle muotoillun korokkeen aukon päälle on liimattu huokoista Millipore-paperia. Se pitää verkkokalvon paikoillaan, joten elatusainevirtaus ei pääse liikkuttamaan ja rasittamaan verkkokalvoa. Huokoisuutensa ansiosta Millipore-paperi ei häiritse sähköistä yhteyttä nes-



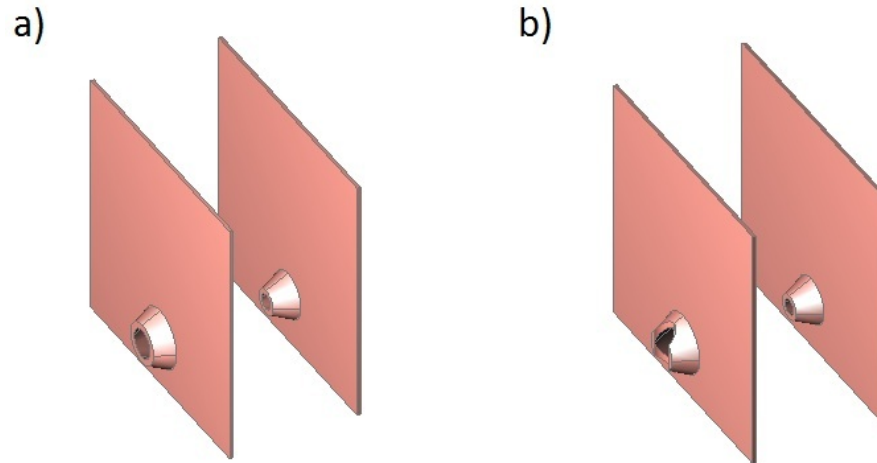
Kuva 19: Näytepidin samanaikaiseen TERG- ja LERG- rekisteröintiin.

tealtaisiin eikä myöskään estä ionien ja ravinteiden siirtymistä nestealtaasta verkkokalvolle

Työssä käytettiin kahdenlaista verkkokalvon pidintä, jotka on esitetty kuvassa 20. Verkkokalvon korokkeen vastinosan täytyy olla sellainen, että se ei peitä verkkokalvoa, jotta verkkokalvoa voidaan katsoa invertoidulla mikroskoopilla. Toinen käytetyistä vastinosista on täysin avonainen, joten elatusainevirtaus pääsee huuhtomaan suoraan näköaistinsolukerrosta. Siten virtaus kuitenkin rasittaa näköaistinsolukerrosta. Toisessa vastinosassa verkkokalvo on suojattu suoralta virtaukselta, joten verkkokalvon olosuhteet ovat stabiilimmat. Tämä kuitenkin voi heikentää ravinteiden kulkeutumista näköaistinsoluille.

Verkkokalvo asetetaan verkkokalvon pitimen levyjen väliin proksimaalinen puoli korokkeeseen päin. Levyt puristetaan yhteen sekä tiivistetään tyhjiörasvalla. Verkkokalvon pidin asetetaan tiiviisti näytepitimen uraan, joten minimoidaan sähkövirran vuoto verkkokalvon ohi. Verkkokalvon keskiosa lepää Millipore-paperin päällä, ja sen pintaa huuhtelee elatusainevirtaus n. 1-2 ml/min virtausnopeudella. Virtaus tuodaan näytepitimeen  $\varnothing 1,2$  mm olevan injektioneulan kautta ja liuos poistuu  $\varnothing 1,6$  mm:sen injektioneulan kautta. Injektioneulojen väliin jäävä virtaus kulkee verkkokalvon yli pääosin laminaarisesti, joten nestealtaan neste vaihtuu hitaasti. Näytepitimen toisessa päässä on lasinen ikkuna, joka on liimattu nestetiiviisti paikoilleen. Valostimulus kulkee ikkunan läpi horisontaalisesti nestekanavan läpi verkkokalvolle.

Samanaikaisiin TERG- ja LERG-rekisteröinteihin tarvitaan yhteensä neljä mittauselektrodia. Makroelektrodeina käytetään Ag/AgCl-pellettielektrodeja (WPI EP2). Näytepitimessä on kaksi vaihtoehtoa makroelektrodien sijoitukselle. Kuvassa 19 makroelektrodit on asetettu suoraan nestealtaisiin, joten ne altistuvat elatusaineen glukosille, mikä hiljalleen heikentää elektrodien toimintaa. Toinen mahdollisuus on



Kuva 20: Verkkokalvon pitimet. a) Vastinlevy on avonainen, joten virtaus huuhtelee näköaistinsolukerrosta suoraan. b) Verkkokalvo on suojattu vastinlevyllä suoralta virtaukselta, jolla minimoidaan virtauksen aiheuttama mekaaninen rasitus.

asettaa makroelektrodit erillisiin elektrodikammioihin, joissa oleva neste on erotettu elatusaineesta huokoisella materiaalilla, joka läpäisee ioneja, mutta ei glukosia. Mikroelektrodit tuodaan verkkokalvolle viistosti ylhäältäpäin avonaisen nestealtaan kautta.

Näytepitimen pohjassa on lasinen läpinäkyvä ikkuna, mikä mahdollistaa verkkokalvon katselun invertoituun mikroskooppiin kytketyn videokameran avulla. Lasiikkunana käytetään 0,13 mm paksua peitinlasia, joka on liimattu paikoilleen vesitiiviisti käyttäen tyhjiörasvaa. Verkkokalvoa valaistaan infrapunavalolla, joka ei stimuloi verkkokalvon soluja, mutta mahdollistaa videokameran käytön.

### 5.3 Mikromanipulaatio ja mikroelektrodit

LERG-tekniikassa on tärkeää tuntea mittauselektrodin paikka tarkasti suhteessa verkkokalvon pintaan. Laitteistoon kuuluu kaksi mikromanipulaattoria, joilla lasikapillaarielektrodeja voidaan liikuttaa x-,y- ja z-suunnissa. Mittauselektrodin mikromanipulaattorissa (Narishige MC-35A) on karkea säätö sekä hydraulinen hienosäätö. Hienosäädön avulla mikroelektrodia voidaan liikuttaa  $0,2 \mu\text{m}$  tarkkuudella. Mikromanipulaattori on asennettu  $60^\circ$  kulmaan verkkokalvon tasoon nähden, joten mittauselektrodilla voidaan tunkeutua verkkokalvoon viistosti. Siten mittauselektrodi työntyy rekisteröinnin kohteena olevien näköaistinsolujen soluvälitilaan vasta halutulla syvyydellä, jolloin rekisteröinnin kohteena olevia soluja vahingoitetaan mahdollisimman vähän. Referenssielektrodi ohjataan mikromanipulaattorin (Narishige MN-151) avulla verkkokalvon pintaan.

Mittauselektrodina käytetään hyvin ohutkärkistä lasipipettiä, joka valmistetaan filamentillisista 1 mm lasikapillaareista (WPI 1B100F-4) vetolaitteen (Sutter Instrument Co. Model P-97 flaming/brown micropipette puller) avulla. Lasikapillaareissa



on sisällä hyvin ohut lasifilamentti, joka helpottaa pipetin täyttöö. Valmiin mikropipetin kärjen halkaisija on n.  $1\ \mu\text{m}$ . Pipetti täytetään sähköisen resistanssin pienentämiseksi  $0,3\ \text{M}$  KCl suolaliuoksella, joka on yhteydessä Ag/AgCl-pellettielektrodiin. Tätä suuremmat suolapitoisuudet todettiin aiheuttavan häiriötä mittauksiin, joka johtui mahdollisesti diffuusiiovirtauksesta pipetin ja elatusaineen välillä.

Referenssielektrodin lasipipetti valmistettiin  $1\ \text{mm}$  filamenttittomasta lasikapillaarista (WPI TW100-6). Pipetin kärjen paksuus tulee valita niin, ettei referenssielektrodi ole mittaustilanteessa mittaaselektrodin tiellä. Pipetin kärki on kuitenkin oltava riittävän suuri, ettei referenssielektrodi aiheuta merkittävää lisäresistanssia mittaaselektrodiin nähden. Sopivaksi referenssielektrodin lasipipetin kärjen halkaisija havaittiin n.  $20\text{--}50\ \mu\text{m}$ . Pipetti täytetään suolaliuoksella, jonka suolapitoisuudet vastaavat elatusaineen ionivahvuuksia, joten ei synny diffuusiiovirtausta. Elektrodien yhteenlaskettu resistanssi on  $1\text{--}3\ \text{M}\Omega$ . Suuren resistanssin takia LERG-tekniikassa on suurempi signaalikohina kuin TERG-tekniikassa, jossa makroelektrodien yhteenlaskettu resistanssi on vain  $10\ \text{k}\Omega$  luokkaa.

## 5.4 Elatusaineliuosvirtaus ja lämmitys

Verkkokalvoa ravitaan elatusainevirtauksella kokeen ajan, jotta verkkokalvon solut pysyisivät mahdollisimman hyvässä kunnossa. Näytepitimessä on mahdollisuus käyttää elatusainevirtausta verkkokalvon molemmilla puolilla, mutta alustavissa kokeissa virtausta käytettiin verkkokalvon distaalaisella puolella ja virtausnopeutena pidettiin  $1\text{--}2\ \text{ml/min}$ .

Diplomityön kokeissa elatusaineena käytettiin muokattua Ringerin liuosta. Ringerin liuos on isotoninen liuos, jolla jäljitellään fysiologisia solun olosuhteita. Työssä käytetty Ringerin liuos koostui seuraavista aineista:  $133,9\ \text{mM}\ \text{Na}^+$ ;  $3,3\ \text{mM}\ \text{K}^+$ ;  $1\ \text{mM}\ \text{Ca}^{2+}$ ;  $2\ \text{mM}\ \text{Mg}^{2+}$ ;  $143,2\ \text{mM}\ \text{Cl}^-$ ;  $10\ \text{mM}$  glukoosi;  $0,01\ \text{mM}$  EDTA;  $6\ \text{mM}$  HEPES;  $20\ \text{mM}\ \text{HCO}_3^-$ . Vetykarbonaatti eli  $\text{HCO}_3^-$  ja HEPES toimivat liuoksessa pH-puskurina. Lisäksi Ringer-liuokseen lisättiin Leibovitzin L-15 kasvatusainetta  $0,72\ \text{mg/ml}$ , joka sisältää tärkeitä suoloja, aminohappoja, vitamiineja ja galaktosia sekä pH-indikaattoria (Fenolipunainen). Valmista Ringer-liuosta kuplitettiin  $5\ \%$  hiilidioksidikaasulla koko kokeen ajan, jolloin bikarbonaattipuskuri ajoi pH:n fysiologisesti sopivaksi  $37\ ^\circ\text{C}$  lämpötilassa ( $\text{pH} \approx 7,5$ ). Lisäksi liuokseen lisättiin  $20\ \mu\text{M}$  APB ja  $100\text{--}120\ \mu\text{M}\ \text{BaCl}_2$ , jotta saataisiin rekisteröityä ainoastaan näköaistinso-lujen tuottamia vasteita.

Verkkokalvon lämpötilaa säädettiin elatusaineen lämpötilan avulla. Elatusaineliuos lämmitettiin kuparisen lämmönvaihtimen avulla. Lämpötila mitattiin verkkokalvon pitimen korokkeen kohdalta elatusaineeseen upotettavan lämpövastuksen avulla ennen koetta ja kokeen jälkeen.

## 5.5 Häiriösuojaus

Näytepidin ja osa laitteistosta on rakennettu Faradayn häkin sisään sähköisten häiriöiden minimoimiseksi. Kaikki Faradayn häkin sisällä olevat elektroniset laitteet ja metalliosat on lisäksi maadoitettu samaan potentiaaliin. Sähköiset häiriöt pääsevät kulkemaan myös liuosletkuja pitkin Faradayn häkkiin. Faradayn häkin ulkopuolelta tuleva liuosvirtaus on maadoitettu suolasillan ja kondensaattorin avulla. Kondensaattori toimii yksinkertaisena ylipäästösuodattimena ja päästää korkeataajuiset häiriöt signaalimaahan. Lisäksi nestekontakti liuosastiasta Faradayn häkin sisäpuolelle katkaistaan byretillä, jolloin elatusliuos kulkee tipoittain byretin läpi liuosletkuihin ja niitä pitkin Faradayn häkin sisäpuolelle.

Kokeissa käytetään tarkasti kontrolloituja valostimuluksia. Häiriövalojen pääsy verkkokalvolle minimoidaan suorittamalla kokeet pimeässä huoneessa ja käyttämällä hajavaloilta suojaavaa Faradayn häkkiä. Mekaanisia häiriöitä pyritään välttämään tärinävaimennetun pöydän avulla, jonka päälle laitteisto on rakennettu. Pöytä toimii paineilman avulla. Säättämällä pöydän ilmanpainetta voidaan vaikuttaa aikavakioon, jolla pöytä vaimentaa ulkopuolisia mekaanisia häiriöitä.

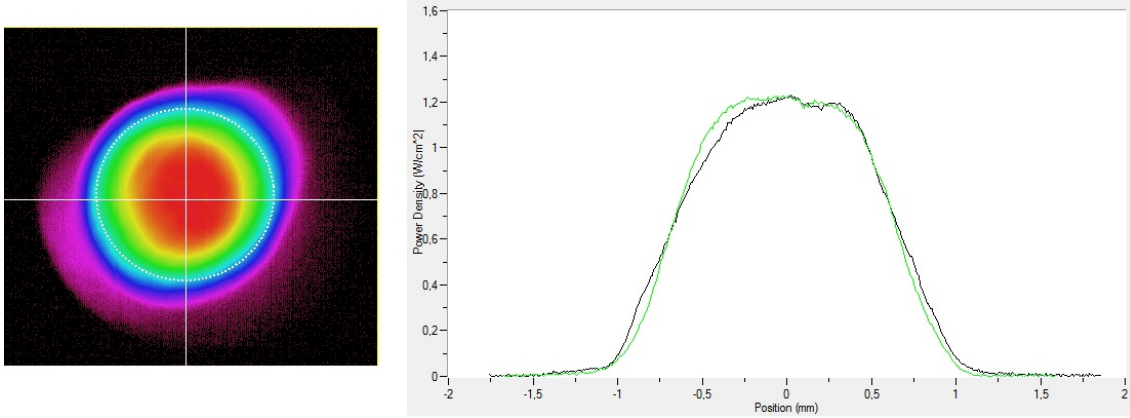
## 5.6 Valostimulusjärjestelmä

Laitteistossa käytetään valolähteenä kahta vihreää LEDiä (Philipsin Luxeon Rebel LXML-PM01-0100). LEDien aallonpituus on 532 nm ( $\pm 0,5$  nm) ja tyypillinen spektraalinen puoliarvoleveys on 30 nm. Intensiteetti on jakautunut gaussisesti aallonpituuden funktiona. LEDejä voidaan ohjata 0 - 1 A virralla. 350 mA:n virralla LEDeille luvattu minimiluminesenssi on 100 lm. Maksimivirralla luminesenssi on n. 185 lm. [45] LEDien valo ohjataan kaksihaarisella valokaapelilla Faradayn häkkiin, jossa se kohdistetaan linssien avulla näytepitimeen. Stimulusvalo kohdistetaan siten, että se on mittausalueella mahdollisimman homogeeninen. Valojärjestelmän valovoimakkuusprofiili verkkokalvon tasossa on esitetty kuvassa 21.

LEDejä ohjataan Seppo Virtasen erikoistyönään suunnitteleamalla kaksikanavaisella virta-jännitemuuntimella [48]. Virta-jännitemuunninta on muokattu siten, että molemmista kanavista saadaan 0 - 10 V ohjausjännitteellä 0 - 1 A virta. LEDejä ohjataan tietokoneeseen liitetyllä datankeruukortilla, jolla voidaan antaa minimissään 1 ms jännitepulsseja.

Valostimuluksen voimakkuutta voidaan säätää jänniteohjauksella n. 2,5 dekadia. Säästövaran lisäämiseksi toisen valokanavan voimakkuus on säädetty optisilla suotimilla 2 dekadia toista heikommaksi, joten voimakkuutta voidaan säätää n. 4,5 dekadia muuttamatta stimuluksen kestoa.

LEDiltä näytepitimelle saapuva maksimi-intensiteetti mitataan kalibroidun fotodiodin avulla. Fotodiodi muuttaa valon virraksi, joka mitataan virtamittarilla. Tietyllä aallonpituudella saatu valon intensiteetti voidaan muuttaa fotodiodin teknisten tietojen avulla yksikköön  $[W/\mu m^2]$ . Kun tiedetään valostimuluksen aallonpituusjakauma, voidaan laskea valostimuluksen intensiteetti  $I_0(\lambda)$  yksikössä  $[fotonia/\mu m^2 s]$



Kuva 21: Valolähteenä käytettyjen LEDien valovoimakkuusprofiili paikan suhteen. Profiilia on havainnollistettu 2D-kuvassa sekä erikseen x- ja y-suunnissa. Käytetyllä mittausalueella ( $\varnothing 1$  mm) valostimulus on hyvin homogeeninen. Mittaus on tehty profilikameralla (Spiricon Laser Beam Diagnostics Model SP503U)  $\varnothing 2$  mm reiän läpi.

tietyllä aallonpituusvälillä. LEDin spektrinä käytettiin valmistajalta saatua spektriä tyypilliselle LEDille, jonka maksimiaallonpituus on välillä 530 - 535 nm.

Valostimuluksen voimakkuuden aiheuttamaa vaikutusta verkkokalvolla kuvataan sen aiheuttamien fotoisomerisaatioiden määrällä sauvasolua kohti, eli kuinka monta rodopsiinimolekyyliä stimulus keskimäärin muuttaa aktiiviseen muotoon yhdessä sauvasolussa ( $Rh^*/\text{solu}$ ). Fotoisomerisaatioiden määrää voidaan arvioida ottamalla huomioon hiiren sauvasolujen dimensiot, verkkokalvon geometria, rodopsiinitiheys ja kvanttitehokkuus sekä rodopsiinin absorptiotodennäköisyyden aallonpituusriippuvuus. Kvanttitehokkuudella tarkoitetaan kuinka suurella todennäköisyydellä rodopsiinin kromofori isomerisoituu, kun se absorboi fotonin.

Yhden sauvasolun tehokas keruualue voidaan laskea kaavalla

$$a_c = f \frac{\pi d^2}{4} [1 - 10^{-\Delta D(\lambda)l}] \gamma, \quad (23)$$

missä  $d$  ja  $l$  ovat sauvasolun ulkojäsenen halkaisija ja pituus,  $f$  kuvaa sisäjäsenen valoa keräävää vaikutusta ( $f \geq 1$ ),  $\gamma$  fotoisomerisaation kvanttitehokkuutta ja  $\Delta D(\lambda)$  sauvasolun optista tiheyttä valon aallonpituudella  $\lambda$ . [49]

Diplomityön kokeissa verkkokalvo on asetettu niin, että valo osuu ensin näköaistinso-lupuolelle, joten sisäjäsenen valoa keräävä vaikutus voidaan jättää huomiotta ( $f=1$ ). Sauvasolun optinen tiheys absorption maksimiaallonpituudella  $\lambda_{max} = 498 \text{ nm}$  on  $\Delta D(\lambda_{max})=0,016 \text{ 1}/\mu\text{m}$  [50]. Sauvasolujen optisen tiheys tietyllä aallonpituudella  $\Delta D(\lambda)$  saadaan Govardovskii ym. mallin mukaisista arvoista eri aallonpituuksille  $\Delta D(\lambda) = k_\lambda \Delta D(\lambda_{max})$  [51]. Käyttäen sauvasolun ulkojäsenen pituutena  $l=24 \mu\text{m}$  ja halkaisijana  $d=1,4 \mu\text{m}$  [46] ja kvanttitehokkuutena  $\gamma=2/3$  [47] voidaan laskea tehokas keruualue tietyllä aallonpituudella  $a_{c,rod}(\lambda)$ .

Näistä tiedoista saadaan laskettua keskimääräinen fotoisomerisaatioiden määrä sauvasolua kohti tietyllä aallonpituudella ( $\Phi(\lambda)=[\text{Rh}^*/\text{solu}]$ ) yhtälöllä

$$\Phi(\lambda) = I_0(\lambda) * a_{c,rod}(\lambda). \quad (24)$$

Kun tiedetään LEDien spektri ja fotodiodin herkkyys kyseisillä aallonpituuksilla, voidaan valostimuluksen aiheuttama keskimääräinen fotoisomerisaatioiden määrä sauvasolua kohti laskea yhtälöllä

$$\Phi = t \sum_i I_0(\lambda_i) * a_{c,rod}(\lambda_i), \quad (25)$$

missä  $t$  on valostimuluksen kesto. Työssä keskimääräinen fotoisomerisaatioiden määrä sauvasolua kohti laitteiston LEDille laskettiin valmistajalta saatujen tietojen perusteella käyttäen 1 nm pituista aallonpituusväliä aallonpituusalueella 432 nm:stä 632 nm:iin, jolloin valostimuluksen aiheuttama teoreettinen isomeraatioiden määrä saatiin laskettua tarkasti. Virhettä voi kuitenkin aiheuttaa fotodiodilla mitattu verkkokalvolle saapuva maksimivaloteho, koska fotodiodia ei saatu asetettua näytepitiimeen, vaan verkkokalvon kohta arvioitiin ilman näytepidintä. Tällöin näytepitimen mahdollinen vaimentava vaikutus jää huomiotta.

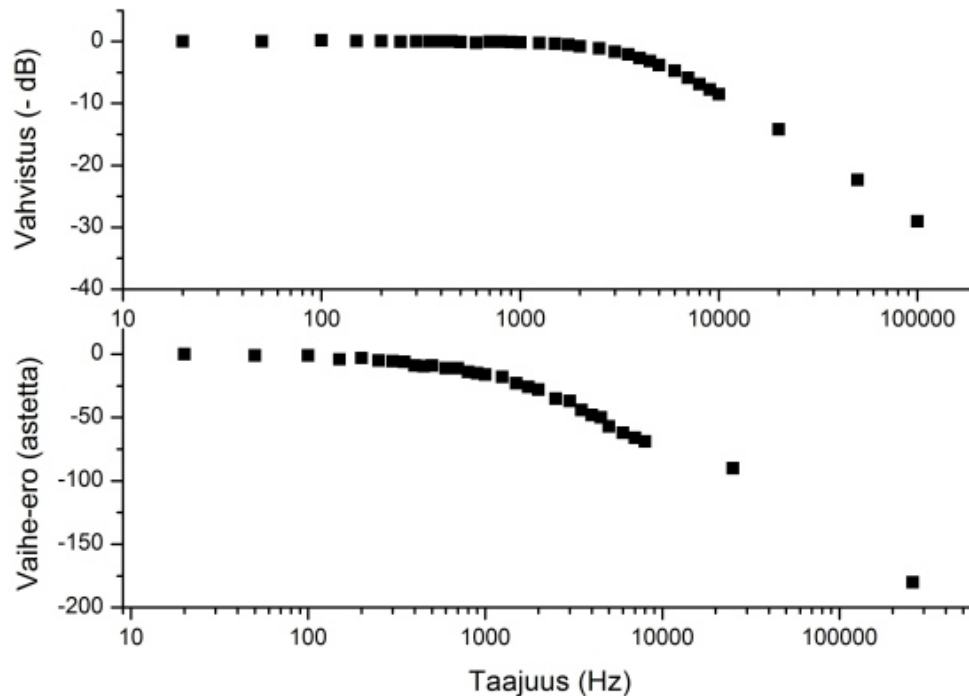
## 5.7 Datankeruu

TERG- ja LERG-signaalit vahvistuksessa ja suodatuksessa käytetään samanlaisia datankeruujärjestelmiä. Ag/AgCl-elektrodeilla rekisteröity signaali vahvistetaan 100-kertaiseksi differentiaalisella esivahvistimella ja sen jälkeen 10-kertaiseksi kaupallisen 8-napaisen Besselin suotimen avulla. Yhteensä vahvistus on siis 1000-kertainen. Besselin suotimen alipäästösuodatuksen katkaisutaajuutena käytetään 500 Hz ja se tuottaa 1 ms viipeen kaikilla taajuuksilla. Signaali AD-muunnetaan datankeruukortilla 1000 Hz näytteenottotaajuudella ja tallennetaan tietokoneelle.

Esivahvistimen on suunnitellut Heikki Säteri kandidaatintyönään. Esivahvistimessa käytetään differentiaalisena vahvistinkytkentään perustuvaa ratkaisua. Lisäksi vahvistimessa on automaattinen siirtojännitteen nollaus, joka kumoaa mittauselektrodien välisen siirtojännitteen vaikutuksen. Automaattista siirtojännitteen nolлаusta käytetään tietokoneelta. [52] Lisäksi mittauselektrodien ja esivahvistimen välissä on manuaalinen siirtojännitteen säätö, josta voidaan suorittaa mittauselektrodien välisen siirtojännitteen karkea nolлаus. Esivahvistimien piirikaavio on nähtävissä liitteessä 8.

Esivahvistimen jännitevahvistus pysyy vakioero 1 kHz:n taajuuteen asti, jonka jälkeen nähdään pientä vaimennusta. Jännitevahvistus putoaa 3 dB 4,5 kHz:n kohdalla. Esivahvistimen tuottama vaihe-ero kasvaa lineaarisesti taajuuden kasvaessa 2,5 kHz asti. Vakioviiheen suuruus on 40  $\mu s$ . Robson ym. [53] tutkimuksissa todettiin näköaistinsolun a-aallon taajuusalueen olevan n. 0 - 500 Hz:n, joten esivahvistimen epälineaarisuudet eivät vaikuttaneet mittaustuloksiin. Esivahvistimen taajuusvaste on

esitetty kuvassa 22. Esivahvistimen taajuusvaste ei riippunut kuormasta kuorman ollessa alle  $5\text{ M}\Omega$ .



Kuva 22: Esivahvistimen taajuusvaste. Samanlaista esivahvistinta käytetään sekä LERG- että TERG-rekisteröinneissä. Kuorma ei vaikuttanut taajuusvasteeseen kuorman ollessa alle  $5\text{ M}\Omega$ .

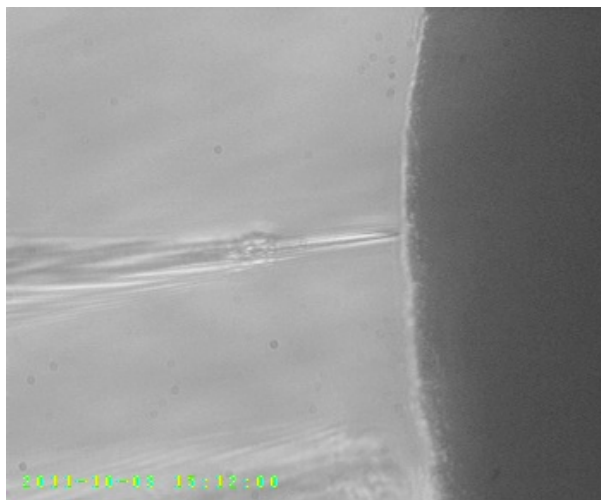
## 5.8 Mittausten kulku

Diplomityön mittaukset tehtiin CB57BL/6-hiirikannalla. Ennen koetta hiiriä pimeä-adaptoitiin yön yli pimeässä huoneessa, jotta sauvasolujen herkkyys olisi mittauksissa mahdollisimman hyvä. Hiiri tainnutettiin ensin hiilidioksidin avulla, minkä jälkeen se tapettiin taittamalla niskat. Silmä irrotettiin ja leikattiin auki sarveiskalvon ja kovakalvon yhtymiskohdasta eli noin silmän keskikohdasta. Silmästä poistettiin linssi ja silmän pohja siirrettiin Ringerin liuokseen. Liuoksessa verkkokalvo irrotettiin kovakalvosta, suonikalvosta ja pigmenttiepiteelistä mahdollisimman varovasti ja siirrettiin näytepitimeen. Koko preparointi suoritettiin heikossa punaisessa valossa, mikä stimuloi hiiren sauvasoluja mahdollisimman vähän, mutta mahdollisti preparoinnin.

Näytepidin asetettiin Faradayn häkkiin mikroskoopin näytepöydälle sille suunnitellulle paikalle ja näytepidin yhdistettiin Ringer-virtaukseen ja mittauselektroniikkaan. Elatusainevirtaus tasapainotettiin ja lämpötila säädettiin  $37^{\circ}\text{C}$ :seen ennen kokeen alkua, minkä jälkeen lämpövastus poistettiin näytepitimestä. Verkkokalvon annettiin stabiloitua uusiin olosuhteisiin vähintään tunnin ajan. Lämpötila tarkastet-

tiin vielä kokeen loputtua. Lämpötilan arvioitiin vaihtelevan n.  $\pm 1$  °C kokeen aikana perustuen ennen koetta ja kokeen jälkeen mitattuihin lämpötiloihin.

Mikroelektrodit asetettiin heikossa punaisessa valossa siten, että verkkokalvon pinta ja molemmat elektrodit nähtiin samaan aikaan mikroskooppiin kytketyllä videokameralla. Mittauselektrodi ja verkkokalvon mittausalue säädettiin samaan tarkennustasoon. Tämän jälkeen referenssielektrodi vietiin verkkokalvon pinnan tuntumaan. Tilanne on näytetty videokameran kuvankaappauksessa (kuva 23).



Kuva 23: Kuvankaappaus mikroskooppiin liitetyllä videokameralla. Kuvassa oikealla on verkkokalvon pinta. Mittauselektrodi on verkkokalvon pinnassa sekä tarkennustasoa hieman ylempänä kuvan alalaidassa on referenssielektrodi.

Verkkokalvon pinnan sijainnin suhteessa mittauselektrodiin määrittämiseksi suhteessa mittauselektrodiin elektrodia vietiin hitaasti verkkokalvon pintaa kohti. Oskilloskoopista seurattiin signaalitasoa. Kun mittauselektrodi upposi verkkokalvoon, oskilloskoopilla nähtiin tasomuutos elektrodien välisessä jännitteessä. Tästä kohdasta mittauselektrodia vietiin hyvin vähän taaksepäin, kunnes jännite oli alkuperäisellä tasolla. Tätä syvyyttä käytettiin referenssisyvyytenä, johon mittauselektrodin paikkaa verrattiin. Diplomityön kokeissa mittauselektrodia siirrettiin tältä syvyydeltä 20-25  $\mu m$  syvemmälle sauvasolujen ulkojäsenkerrokseen lähelle ciliumia.

Verkkokalvosta rekisteröitiin vasteita eri stimulusvalon voimakkuuksilla. Stimuluksen kestonä käytettiin yhtä millisekuntia. Vasteita kerättiin niin, että heikoimmat stimulut tuottivat n. 10 %:n vasteen saturaatiotasosta ja suurimmat saturoivat sauvasolut selvästi.

Kaikki mittausdata tallennettiin tietokoneelle datankeruukortin avulla. Mittaukset analysoitiin ERG-vasteiden analysointiin kehitetyn Anabin-ohjelman avulla. Ensin vasteista vähennettiin stimulusta edeltävä jännitteen nollassa, ja samalla intensiteetillä otetut vasteet keskiarvoistettiin. Eri stimuluksen intensiteeteillä otetuista vasteista koottiin vastejoukko, jota kutsuttiin vasteperheiksi. Vasteita visualisoitiin ja vertailtiin Origin-ohjelmalla. Vasteiden analyysissä verrattiin TERG- ja LERG-vasteiden amplitudeja sekä kinetiikkaa.

## 6 Ulkojäsenen LERG-vasteiden ja näköaistinsolujen TERG-vasteiden vertailu

Laitteistoa testattiin rekisteröimällä samanaikaisesti LERG-vasteita ulkojäsenkerroksesta sekä TERG-vasteita verkkokalvon yli. Koetuloksia saatiin viidestä verkkokalvosta, joista kerättiin yhteensä 8 vasteperhettä. Koeohjelman tarkoituksena oli selvittää heijastelevatko TERG-vasteet CNG-virran muutoksia, ja muokkaavatko sisäjäsenen jänniteherkät kanavat TERG-signaalin aikakäyttäytymistä lyhyillä valostimuluksilla.

Koeohjelmassa verrattiin ulkojäsenen LERG-vasteita ja näköaistinsolujen TERG-vasteita analysoimalla vasteiden maksimiamplitudeja ja aikaa, jossa vaste saavuttaa maksimiamplitudin (TTP). Lisäksi vasteisiin sovitettiin aktivaatiomallia sekä määritettiin fototransduktiokaskadin katkaisukinetiikkaa kuvaavat aikavakiot  $\tau_D$  ja  $\tau_{rec}$ . Koeohjelman kokeet on numeroitu, ja samaa numerointia käytetään kaikissa vertailuissa. Esitetyjen LERG- ja TERG-vasteperheiden toimintakäyriin sovitettiin lineaarista kombinaatiota eksponentiaalisesta funktiosta ja Michaelis-funktiosta

$$\frac{R}{R_{max}} = (1 - \alpha)(1 - e^{-SI}) + \alpha\left(\frac{I}{I + S^{-1}}\right), \quad (26)$$

missä  $R$  on vasteen amplitudi,  $R_{max}$  vasteperheen saturaatioamplitudi,  $\alpha$  on funktion painokerroin ( $0 \leq \alpha \leq 1$ ),  $I$  valostimuluksen voimakkuus ja  $S$  vasteiden herkkyyttä kuvaava parametri yksikössä  $[Rh^{*-1}]$  [50].

### 6.1 Mittaustulokset

#### 6.1.1 LERG-vasteet näköaistinsolujen ulkojäsenkerroksen yli

Kuvassa 24 a on esitetty ulkojäsenkerroksesta rekisteröity LERG-vasteperhe. Eri kokeissa rekisteröityjen vasteperheiden pienimmän vasteen amplitudi oli n. 5-15 % saturaatioamplitudista ja suurin vaste oli selvästi satureitunut. Valon voimakkuutta kuvattiin yksiköllä  $[Rh^*]$ , joka kuvaa kuinka monta rodopsiinin aktivaatiota kussakin sauvasolussa tapahtui valostimuluksen seurauksena. Pienen amplitudin ja mittauselektrodin suuresta resistanssista johtuvan suuren signaalikohinan takia ulkojäsen-vasteiden signaali-kohinasuhde on heikohko. Pienvasteita keskiarvoistettiin signaali-kohinasuhteen parantamiseksi n. 30 kpl ja satureituneita vasteita vähintään 5 kpl. Muiden keskiarvoistettujen vasteiden lukumäärä sijoittui näiden välille.

Kuvissa 24 b ja c on esitetty vasteiden toimintakäyrä ja TTP valon voimakkuuden funktiona. TTP määritettiin kohinaisesta signaalista arvioimalla signaalin kohinauhan keskeltä kohta, jossa vaste saavutti maksimiamplitudin. Vasteiden amplitudi nousee valon voimakkuuden kasvaessa, kunnes se saavuttaa saturaatiotason. Tämän jälkeen ainoastaan saturaatioaika kasvaa valon voimakkuutta lisättäessä. Sovittamalla yhtälön (26) mukaista funktiota vasteiden toimintakäyrään saatiin herkkyyss-

parametrin  $S$  suuruudeksi  $0,0060 \text{ Rh}^{-1}$ .

Koeohjelman mittauksista määritettiin saturaatioamplitudin sekä pienvasteiden, puolisaturoituneiden ja saturoituneiden vasteiden TTP:n keskiarvo. Puolisaturoituneiden vasteiden TTP määritettiin lineaarisesti interpoloimalla. Saturoituneen vasteen TTP määritettiin saturaatiotason alkuhetkestä sellaisesta vasteesta, joka oli saatu 1,5 dekadia saturoivaa valostimulusta suuremmalla valon voimakkuudella. Tulokset esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3: Ulkojäsenkerroksesta kerättyjen vasteiden saturaatioamplitudi ja TTP-arvo ja sekä määrittämisessä käytettyjen kokeiden lukumäärä  $n$ .

		<b>n</b>	<b>Keskiarvo</b>	<b>Keskihajonta</b>
Saturaatioamplitudi ( $\mu\text{V}$ )		6	34	10
TTP (ms)	Pienvaste	5	140	24
	Puolisaturoitunut vaste	8	110	26
	Saturoitunut vaste	4	34	10

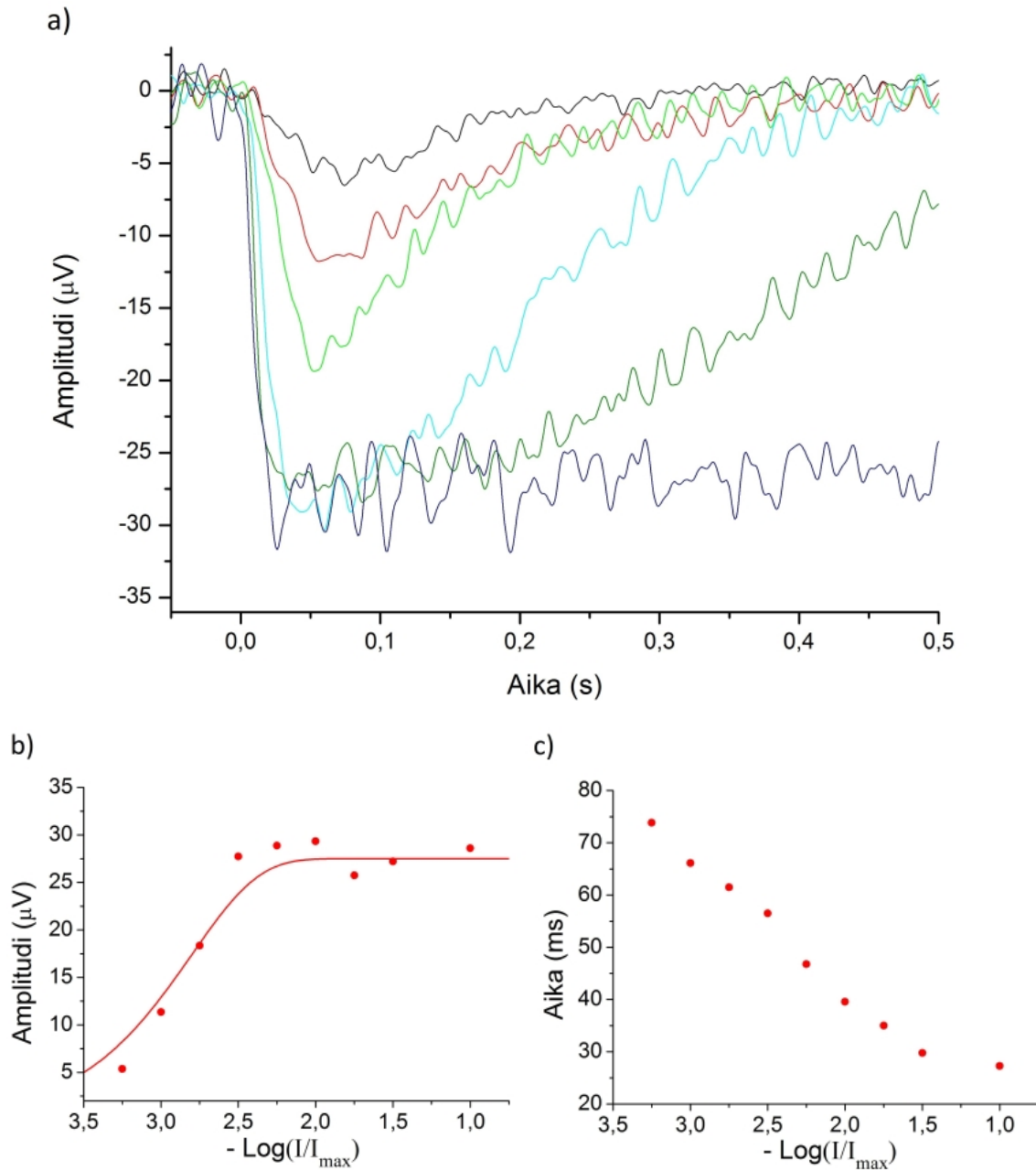
### 6.1.2 Näköaistinsolujen TERG-vasteet

Samanaikaisesti ulkojäsenvasteiden kanssa kerättiin farmakologisesti erotetut näköaistinsolun TERG-vasteet. TERG-tekniikalla saadaan huomattavasti parempi signaali-kohinasuhde, koska vasteiden amplitudi on suurempi ja signaalikohina pienempää. Pienvasteita keskiarvoistettiin  $n. 10$  kpl ja saturoituneita vasteita vähintään 2 kpl. Vasteperhe on esitetty kuvassa 25 a.

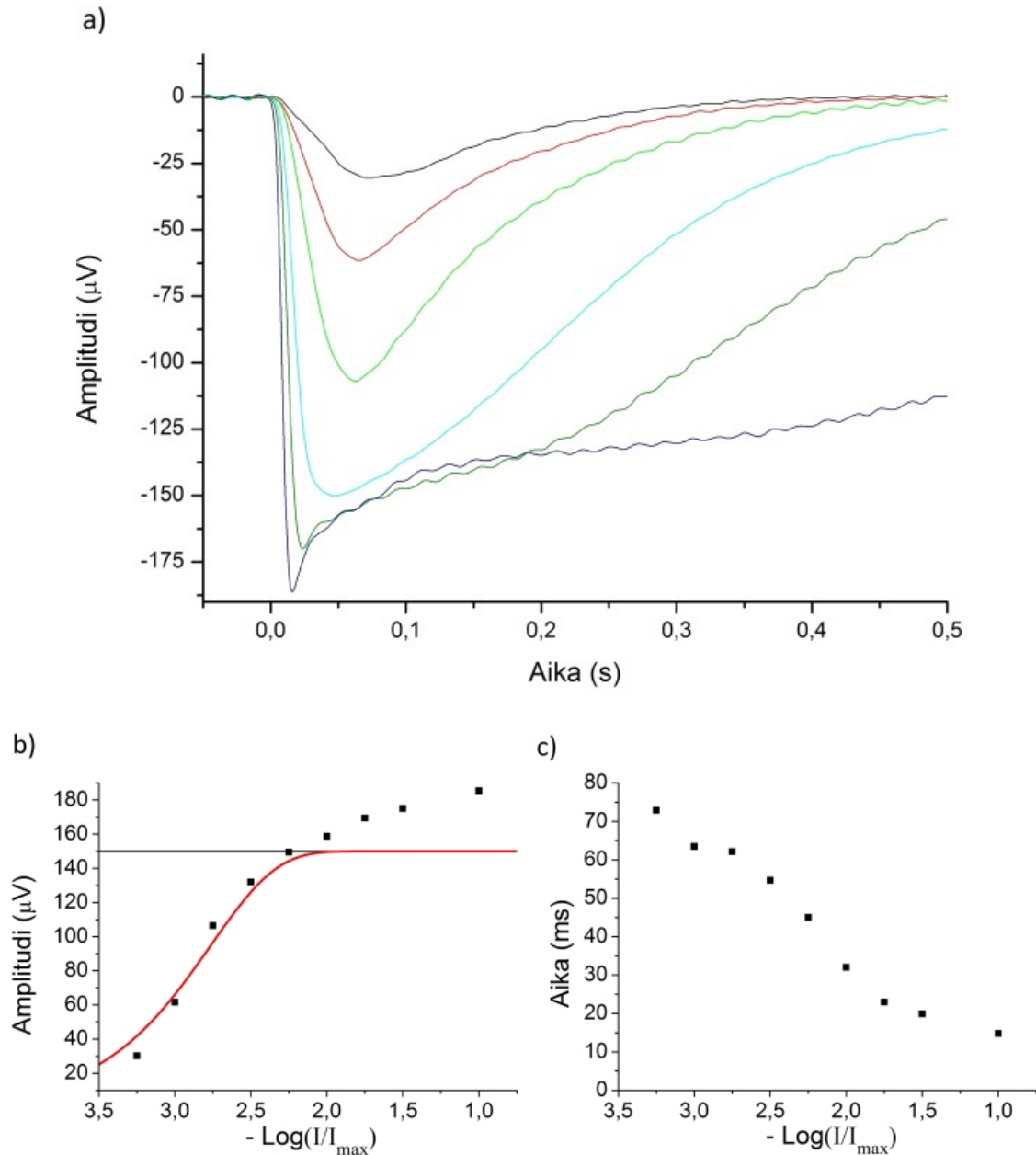
Kuvissa 25 b ja c on esitetty TERG-vasteiden käyttäytymistä valostimuluksen voimakkuuden funktiona. Suurilla valon voimakkuuksilla, joissa on nähtävillä nenäkomponentti, amplitudi mitattiin nenäkomponentin kärjestä eikä transientin nenäkomponentin jälkeiseltä saturaatiotasolta. Amplitudi nousee ensin tasaisesti ja saturoivilla valostimuluksilla hitaammin valostimuluksen voimakkuuden kasvaessa. Sovittamalla yhtälön (26) mukaista funktiota vasteiden toimintakäyrään saatiin herkkyysparametrin  $S$  suuruudeksi  $0,0055 \text{ Rh}^{-1}$ , joka oli lähes sama kuin samaan aikaan mitatulle LERG-vasteperheelle.

TERG-vasteille laskettiin myös saturaatioamplitudin sekä pienvasteiden, puolisaturoituneiden ja saturoituneiden vasteiden TTP:n keskiarvo. Puolisaturoituneiden vasteiden TTP määritettiin lineaarisesti interpoloimalla. Saturoituneen vasteen TTP määritettiin nenäkomponentin kärjestä sellaisesta vasteesta, joka oli saatu 1,5 dekadia saturoivaa valostimulusta suuremmalla valon voimakkuudella. Tulokset kerättiin taulukkoon 4. Saturaatioamplitudit vaihtelivat suuresti kokeiden välillä. Suurin syy tähän on luultavasti verkkokalvolle aiheutetut vauriot, jotka syntyivät irrotettaessa verkkokalvoa silmästä ja asennettaessa verkkokalvoa näytepitimeen.





Kuva 24: a) Ulkojäsenkerroksesta kerätty vasteperhe kokeesta 1. Vasteet on alipäästösuodatettu 100 Hz taajuudella. Kaikkia kerättyjä vasteita ei ole esitetty, jotta kuva pysyisi selkeänä. b) Vasteiden toimintakäyrä johon sovitettu yhtälön (26) mukaista funktiota. Vasteisiin sopi paremmin eksponentiaalinen funktio ( $\alpha = 0$ ) ja herkkyysparametrin  $S$  suuruudeksi saatiin  $0,0060 \text{ Rh}^{*-1}$  c) vasteiden TTP valon voimakkuuden funktiona. Elatusaineliuoksessa  $100 \mu\text{M BaCl}_2$  ja  $20 \mu\text{M APB}$ . Valostimulusten arvioidut voimakkuudet olivat välillä  $50 - 10\,000 \text{ Rh}^*$ .

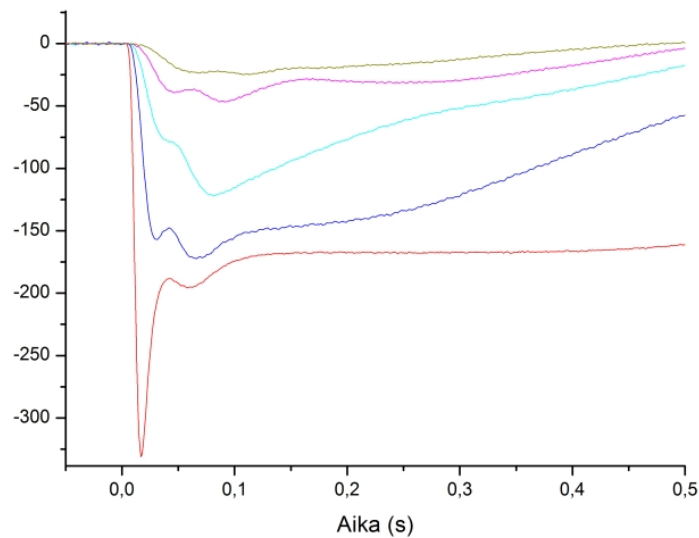


Kuva 25: a) TERG-vasteperhe kokeesta 1. Vasteita on alipäästösuodatettu 100 Hz taajuudella. Kaikkia kerättyjä vasteita ei ole esitetty, jotta kuva pysyisi selkeänä. b) Vasteiden toimintakäyrä, johon on sovitettu yhtälön (26) mukaista funktiota. Amplitudi on mitattu vasteen nenäkomponentin kärjestä, mutta sovituksessa saturoituneille vasteille on käytetty saturaatioamplitudia. Vasteisiin sopi paremmin eksponentiaalinen funktio ( $\alpha = 0$ ) ja herkkyysparametrin  $S$  suuruudeksi saatiin  $0,0055 \text{ Rh}^{-1}$ . Transientin nenäkomponentin jälkeinen saturaatiotaso on merkitty kuvaan vaakasuoralla viivalla. c) Vasteiden TTP valon voimakkuuden funktiona. Elatusaineliuoksessa  $100 \mu\text{M BaCl}_2$  ja  $20 \mu\text{M APB}$ . Valostimulusten arvioidut voimakkuudet olivat välillä  $50 - 10\,000 \text{ Rh}^*$ .

Taulukko 4: TERG-tekniikalla kerättyjen vasteiden saturaatioamplitudi ja TTP-arvoja sekä määrittämissä käytettyjen kokeiden lukumäärä n.

		n	Keskiarvo	Keskihajonta
Saturaatioamplitudi ( $\mu\text{V}$ )		6	350	200
TTP (ms)	Pienvaste	5	110	25
	Puolisaturoitunut vaste	8	90	21
	Saturoitunut vaste	4	14	1

TERG-vasteissa oli usein nenäkomponentin lisäksi nähtävissä komponentteja, jotka eivät ole selitettävissä CNG-kanavavirran muutoksilla. Poikkeavuudet voidaan nähdä vasteiden aaltoiluna vasteen paluuvaiheessa. Vastaava ei esiinny valovirtavasteissa. Ne vääristivät vasteita selvästi, mikä hankaloitti analyysia. Esimerkki tällaisesta kokeesta on esitetty kuvassa 26.



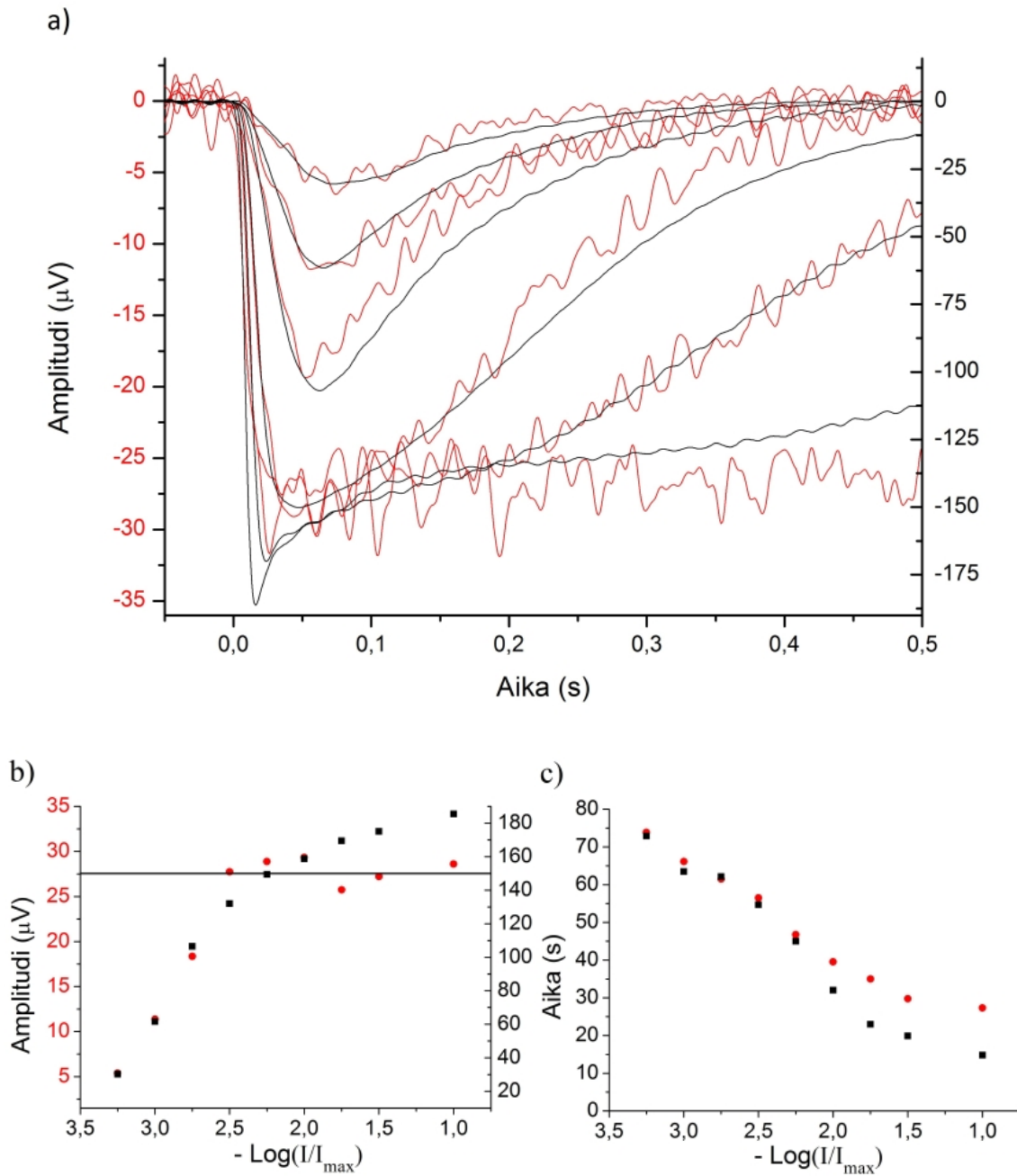
Kuva 26: TERG-vasteperhe. Vasteissa nähtävissä useita tyypillisistä ulkojäsenvas-teperheestä poikkeavia aaltomuotoja. Poikkeavuudet nähdään vasteiden aaltoiluna vasteiden paluuvaiheessa. Elatusaineliuoksessa  $100 \mu\text{M BaCl}_2$  ja  $20 \mu\text{M APB}$ . Valostimulusten voimakkuudet olivat välillä 10 - 3 000  $\text{Rh}^*$ .

## 6.2 LERG- ja TERG-vasteiden vertailu

Kuvassa 27 a esitetty LERG- ja TERG-vasteperheet. Kuvasta nähdään, että normalisoimalla ulkojäsenvasteperheen saturaatiotaso TERG-vasteperheen saturaatiotasolle vasteiden amplitudit sekä kinetiikka vastaavat hyvin toisiaan. Suurin eroavaisuus nähdään TERG-vasteissa voimakkailla valostimuluksilla vasteen alkuosassa. Tällöin TERG-vasteissa on nähtävillä transientti nenäkomponentti (kuvassa 27 a hetkellä  $t \approx 0,2$  s), jota ei nähdä LERG-vasteissa.

LERG- ja TERG-vasteiden amplitudeja ja TTP-arvoja on vertailtu kuvissa 27 b ja c. LERG-vasteperheen saturaatiotaso on normalisoitu TERG-vasteperheen saturaatiotasolle. Skaalatut vasteet muistuttavat mittauksien rajoissa hyvin toisiaan. Poikkeamaa alkaa syntyä saturoituneissa vasteissa, joissa TERG-vasteisiin alkaa muodostua sisäjäsenessä syntyvää nopeaa nenäkomponenttia. Se nopeuttaa ja suurentaa TERG-vasteiden alkuosaa suhteessa ulkojäsenvasteisiin.

LERG- ja TERG-vasteperheiden saturaatiotasoa verrattiin toisiinsa. Ulkojäsenvasteperheen saturaatioamplitudin ja TERG-vasteperheen saturaatioamplitudin suhde laskettiin kuudesta kokeesta. Keskiarvona saatiin, että näköaistinsolujen ERG-signaalista syntyy n.  $13 \pm 7$  %:a ulkojäsenkerroksessa. Yhdessä kokeessa mitattiin ensin ulkojäsenkerroksen vasteita, jonka jälkeen mikroelektrodi siirrettiin näköaistinsolujen synaptiseen kerrokseen ( $100 \mu m$ ). Tällöin mittauksen kohteena olevien solujen olosuhteet ja herkkyys olivat oletettavasti hyvin lähellä toisiaan. Mahdolliset herkkyyserot voivat johtua mittauselektrodin aiheuttamista vahingoista. Ulkojäsenkerroksessa muodostuva vaste oli tällöin n. 10 % näköaistinsolukerroksen ERG-vasteesta.



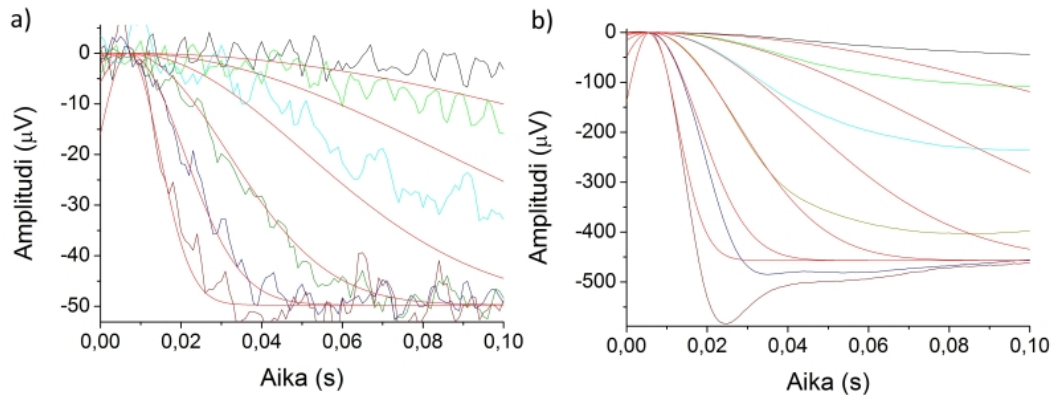
Kuva 27: LERG-vasteet (punainen) ja TERG-vasteet (musta). a) LERG- ja TERG-vasteet kokeesta 1 skaalattuna siten, että vasteperheiden saturaatioamplitudit ovat samassa tasossa. b) Amplitudien vertailu a)-kohdan skaalauksella. Saturaatiotaso on merkitty vaakasuoralla viivalla. c) TTP-arvojen vertailu. Elatusaineliuoksessa  $100 \mu\text{M BaCl}_2$  ja  $20 \mu\text{M APB}$ . Valostimulusten arvioidut voimakkuudet olivat välillä  $50 - 10\,000 \text{ Rh}^*$ .

### 6.2.1 Valovasteen aktivaatio- ja katkaisukinetiikka

Valovasteiden aktivaatio- ja katkaisukinetiikkaa vertailtiin sovittamalla vasteperheisiin aktivaatiomallia ja määrittämällä katkaisukinetiikkaa kuvaavat aikavakiot  $\tau_D$  ja  $\tau_{rec}$ .

#### Aktivaatiomallin sovitukset

Aktivaatiomallia sovitettiin kolmeen vasteperhepariin. Sovituksissa käytettiin samaa aktivaatiokertoimen  $A$  ja viipeen  $t_d$  arvoa yhden vasteperheen kaikkiin vasteisiin. Sovituksen aktivaatiokertoimen arvot vaihtelivat suuresti vasteperheiden välillä niin suhteellisesti kuin absoluuttisesti. Sovituksissa saadut aktivaatiokertoimen arvot on listattu taulukkoon 5 ja aktivaatiosovitus kokeesta 2 on esitetty kuvassa 28. Viive  $t_d$  vaihteli välillä 3 - 7 ms. Kokeen 2 sovituksissa LERG-vasteisiin malli sopi paremmin saturoituneisiin kuin pienempiin vasteisiin. Kaikissa sovituksissa saatiin suurempi aktivaatiokerroin TERG-vasteperheelle. Mittaustarkkuuden rajoissa ei kuitenkaan voida sanoa TERG-vasteiden aktivaation olevan nopeampaa.



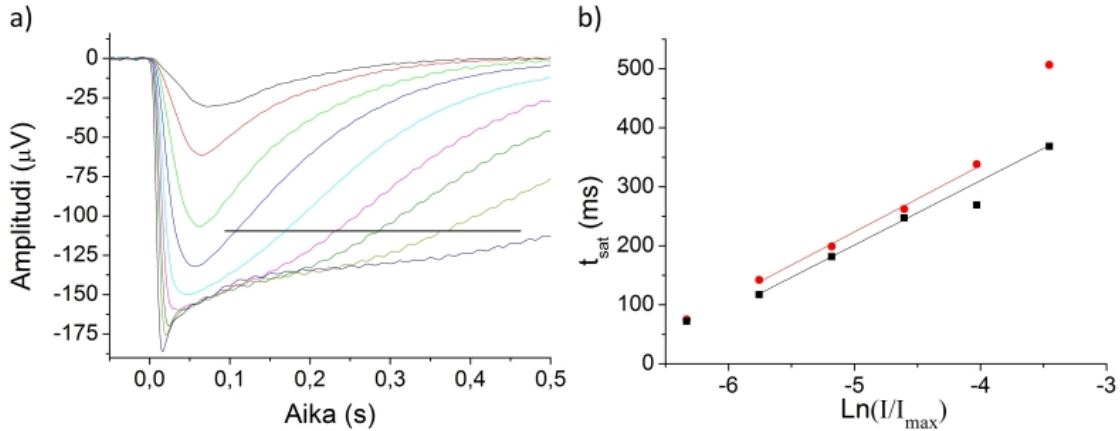
Kuva 28: Aktivaatiomallin sovitukset a) LERG-vasteperheeseen kokeesta 2 ja b) TERG-vasteperheeseen kokeesta 2. Malli sopii hyvin vasteen alkuhetkille, mutta alkaa poiketa vasteesta, kun vasteen katkaisumekanismit kytkeytyvät vasteisiin. Elatusaineliuoksessa  $120 \mu\text{M BaCl}_2$  ja  $20 \mu\text{M APB}$ . Valostimulusten arvioidut voimakkuudet olivat välillä 10 - 3 000  $\text{Rh}^*$ .

Taulukko 5: Aktivaatiomallin sovitusten aktivaatiokertoimet kolmesta kokeesta.

	Aktivaatiokerroin ( $s^{-2}$ )	
	LERG	TERG
Koe 1	5,0	6,5
Koe 2	11	14
Koe 3	1,4	3,1

### Aikavakio $\tau_D$

Aikavakio  $\tau_D$ :n määrittämisen teoria on esitetty luvussa 2.4.3.  $\tau_D$  määritettiin viidestä verkkokalvosta sekä LERG- ja TERG-vasteperheistä.  $t_{sat}$  mitattiin saturoituneista tai lähes saturoituneista vasteista samalta tasolta. Taso valittiin jokaisessa kokeessa erikseen siten, että vasteet olivat palautuneet n. 20-40 % saturaatiotasolta.  $t_{sat}$  ja  $\tau_D$  määrittystä on esitetty kuvassa 29. Määritettyjen aikavakioiden  $\tau_D$  arvot on esitetty taulukossa 6.



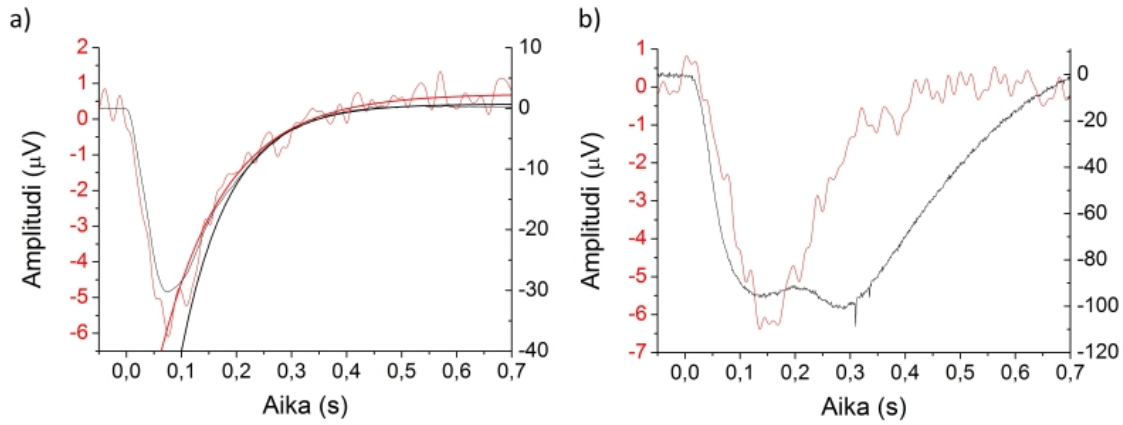
Kuva 29:  $\tau_D$ :n määrittäminen kokeesta 1. a) Tason valinta, jolta  $t_{sat}$  määritettiin TERG-vasteperheestä (vaakasuora viiva). b)  $t_{sat}$  määritetty eri valostimuluksen voimakkuuksilla LERG- ja TERG-vasteista. Saatuihin pisteisiin on sovitettu suorat, joiden kulmakertoimesta saatiin määritettyä  $\tau_D$ . Ulkojäsenvasteet ja sovitukset on esitetty punaisella sekä TERG-vasteet ja sovitukset mustalla. Elatusaineliuoksessa 100  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$  ja 20  $\mu\text{M}$  APB. Valostimulusten arvioidut voimakkuudet olivat välillä 300 - 3 000  $\text{Rh}^*$ .

Taulukko 6:  $\tau_D$  määritettynä viidestä kokeesta.

	$\tau_D$ (ms)	
	LERG	TERG
Koe 1	110	110
Koe 2	170	100
Koe 3	105	190
Koe 4	160	190
Koe 5	130	200
<b>Keskiarvo</b>	<b>135</b>	<b>160</b>
<i>Keskihajonta</i>	<i>30</i>	<i>50</i>

### Aikavakio $\tau_{rec}$

Aikavakio  $\tau_{rec}$  määritettiin kahdesta kokeesta sovittamalla eksponenttifunktiota pienvasteen paluuvaiheen loppuosaan. TERG-vasteissa oli usein  $\tau_{rec}$ :n määrittystä häiritseviä komponentteja, jonka takia määrittys ei onnistunut kaikissa vasteperheissä.  $\tau_{rec}$  määrittys ja määrittymisen estävä TERG-komponentti on esitetty kuvassa 30.  $\tau_{rec}$  määritettiin kokeista, joissa pienvasteiden paluuvaiheissa ei ollut ylimääräisiä aaltokomponentteja. Saadut  $\tau_{rec}$  arvot koottiin taulukkoon 7. Määritetyt aikavakiot vastasivat samoista kokeista määritettyjä  $\tau_D$ :n arvoja.



Kuva 30: LERG-vaste punaisella ja TERG-vaste mustalla a)  $\tau_{rec}$ :n määrittys kokeesta 1. Aikavakio määritettiin sovittamalla eksponenttifunktiota pienvasteen paluuvaiheen loppuosaan b) Bikarbonaattia sisältävässä elatusaineessa nähdään usein komponentteja, jotka häiritsevät  $\tau_{rec}$ :n määrittystä. Näistä vasteista ei määritetty  $\tau_{rec}$ :n arvoa. Elatusaineliuoksessa  $120 \mu\text{M } BaCl_2$  ja  $20 \mu\text{M APB}$ . Valostimuluksen voimakkuus oli  $10 \text{ Rh}^*$ .

Taulukko 7:  $\tau_{rec}$  määritettynä kahdesta kokeesta. Vertailun vuoksi määritetyt  $\tau_D$  arvot samoista kokeista

	$\tau_{rec}$ (ms)		$\tau_D$ (ms)	
	LERG	TERG	LERG	TERG
Koe 1	120	90	110	110
Koe 2	180	110	170	100



## 7 Pohdinnat

Kehitetyllä laitteistolla pystyttiin rekisteröimään LERG-vasteita hiiren ulkojäsenkerroksesta. Vastaavaa mittausta ei ole vielä julkaistu aikaisemmin. Samanaikaisesti pystyttiin myös rekisteröimään farmakologisesti erotettuja näköaistinsolujen TERG-vasteita. Koeohjelmassa saatiin alustavia tuloksia LERG- ja TERG-vasteiden vertailusta. Tässä työssä tehtyjä kokeita tullaan jatkossa suorittamaan lisää ja tulokset tullaan julkaisemaan kansainvälisessä tieteellisessä sarjassa.

LERG- ja TERG-vasteita vertailtaessa huomattiin, että normalisoitaessa molempien vasteperheiden saturaatiotasot samalle tasolle myös ei-saturoituneiden vasteiden amplitudit olivat yhtä suuria. Vasteet käyttäytyivät myös ajallisesti samalla tavalla. Tämän perusteella voidaan olettaa TERG-vasteissa nähtävän saturaatiotason määräytyvän vain valovirrasta eli se vastaa näköaistinsolujen tilaa, jossa kaikki CNG-kanavat ovat kiinni. Suurin eroavaisuus vasteita verrattaessa oli TERG-vasteisiin muodostuva nenäkomponentti, jota ei nähdä ulkojäsenvasteissa. Nenäkomponentti muodostuu siis sisäjäsenkerroksessa.

Vasteiden TTP-arvot olivat ulkojäsenvasteissa hieman hitaampia. Ero ei kuitenkaan ole ei-saturoituneilla vasteilla merkitsevä, koska LERG- ja TERG-vasteiden TTP-arvot ovat toistensa virherajojen sisällä. Saturoituneiden TERG-vasteiden TTP-arvot olivat LERG-vasteiden TTP-arvoja pienempiä, joten voidaan sanoa TERG-vasteisiin muodostuvan nenäkomponentin nopeuttavan vasteiden TTP-arvoja.

Vertailtaessa vasteiden aktivaatiota ja katkaisua huomattiin aktivaatiomallin sovituksissa TERG-vasteiden aktivaation olevan kaikissa sovituksissa nopeampaa. TERG-vasteiden nenäkomponentti voi olla aktivaatiota näennäisesti nopeuttava tekijä. Tällöin nenäkomponentti ei seuraisi CNG-kanavavirran muutoksia, vaan syntyisi siitä erillisenä komponenttina. Sovituksissa oli kuitenkin hyvin paljon hajontaa, minkä takia tulosta ei voida pitää luotettavana. Katkaisukinetiikkaa kuvaavan aikavakion  $\tau_D$  määrittämisessä saatiin virherajat huomioon ottaen samat arvot LERG- ja TERG-vasteperheille. Siten sisäjäsenen jänniteriippuvat kanavat eivät näyttäisi vaikuttavan vasteen katkaisun alkukinetiikkaan. Yksittäisten kokeiden  $\tau_{rec}$  sovituksista saatiin lähes samat arvot kuin  $\tau_D$  määrittämisistä. Tulosten perusteella voidaan olettaa näiden aikavakioiden kuvaavan hiiren sauvasoluissa samaa asiaa eli aktiivisen PDE:n deaktivaation aikavakiota.

Kun verrattiin LERG- ja TERG-vasteita toisiinsa samanaikaisesti suoritetuista kokeista, olosuhteiden aiheuttamat erot minimoituivat. Kuitenkin TERG- ja LERG-vasteissa havaittiin usein herkkyyseroja. Ulkojäsenkerroksen mittauskohtaa valittaessa paikallistettiin verkkokalvolta silmämääräisesti sellainen alue, jossa verkkokalvo vaikutti olevan hyvässä kunnossa. Lisäksi vasteperheitä kerättiin vain alueilta, jossa ulkojäsenvasteiden saturaatiotason amplitudi oli yli  $20 \mu\text{m}$ . Siten valitun alueen solut olivat mahdollisesti herkempiä kuin solut keskimäärin. Toisaalta ulkojäsenkerroksesta mitattaessa mittauspipetti voi vahingoittaa mittausalueen soluja, mikä pienentää vasteiden herkkyyttä.

TERG-mittauksissa vasteet ”keskiarvoistuvat” kaikista mittausalueen soluista. Siten

myös reuna-alueen huonokuntoiset solut voivat vaikuttaa rekisteröityjen vasteiden herkkyyteen. TERG-vasteiden amplitudin voidaan olettaa kertovan verkkokalvon yleisestä kunnosta. Kuitenkaan kokeissa, joissa TERG-vasteiden amplitudi oli korkea, ei nähty merkittäviä eroja vasteiden kinetiikassa verrattaessa kokeisiin, joissa TERG-vasteiden amplitudi oli selvästi pienempi.

TERG-vasteiden paluuvaiheessa nähtiin usein komponentteja, jotka vaikeuttivat analyysiä. Nämä ovat todennäköisesti seurausta sisäjäsenen jänniteherkkien kanavien toiminnasta tai ovat mahdollisesti toisen kertaluvun hermosolujen tuottamia komponentteja. Yleensä komponentit korostuvat TERG-vasteissa erityisesti käytettäessä vetykarbonaattia sisältävää elatusainetta, jolloin vasteiden amplitudi on myös suurempi kuin käytettäessä pH-puskurointiin vain HEPES:stä ilman vetykarbonaattia. Näköaistinsolujen signalointi bipolaarisoluihin estettiin *APB*:n L- ja D-muotojen raseemisella seoksella. Sen tiedetään estävän tehokkaasti synpasivälityksen ON-bipolaarisoluihin, mutta se ei salpaa synapsista yhteyttä OFF-bipolaarisoluihin yhtä tehokkaasti. On myös mahdollista, että TERG-vasteissa nähdyt komponentit olivat seurausta sisemmässä verkkokalvossa OFF-bipolaarisolujen kautta syntyvistä ionivirroista.

TERG-tekniikalla suoritettut rekisteröinnit ovat LERG-tekniikkaa sekä imupipettitekniikkaa stabiilimpia, mikä mahdollistaa TERG-tekniikalla pidempikestoiset kokeet kuin LERG- ja imupipettitekniikalla. Sisäjäsenen jänniteherkät mekanismit muokkaavat valovasteen alkuhetkiä voimakkailla stimulusintensiteeteillä (nenäkomponentti) ja niiden on uskottu muokkaavan myös vasteiden paluuvaihetta. Kuitenkaan  $\tau_D$  sovituksissa paluuvaiheen alun kinetiikassa ei havaittu merkitsevää eroa TERG- ja LERG-vasteiden välillä. Kokeissa, joissa TERG-vasteiden paluuvaiheessa ei havaittu ”ylimääräisiä” komponentteja, TERG-vasteiden aikakäyttäytyminen sekä suhteelliset amplitudit seurasivat CNG-kanavavirran muutoksia yllättävän tarkasti. Jatkokokeissa tullaan tutkitaan TERG-signaalin aikakäyttäytymistä verrattuna LERG-signaaliin ainoastaan HEPES-puskuroidussa elatusaineessa sekä tarkennetaan tuloksia vetykarbonaattia sisältävässä elatusaineessa.

## 7.1 Kirjallisuusvertailu

Koeohjelman tuloksia vertailtiin kirjallisuuden avulla muissa tutkimusryhmissä saatuihin tuloksiin. ERG-tekniikkaa ei ole yleisesti käytetty tekniikka näköaistinsolujen tutkimuksessa. Suurin osa tutkimuksista on tehty käyttäen imupipettitekniikkaa, jossa mitataan yksittäisten näköaistinsolujen ulkojäsenen kalvovirtaa. LERG-tekniikalla rekisteröidään saman kalvovirran aiheuttamia muutoksia soluvälitilan jänniteprofiilissa. Tässä työssä tehtyjen kokeiden perusteella myös TERG-tekniikalla saatuja tuloksia voidaan siis verrata imupipettikokeiden tuloksiin.

Vasteiden amplitudeja vertailtaessa huomattiin näköaistinsolujen olleen tehdyissä kokeissa epäherkempiä kuin yleisesti ajatellaan. Kokeesta 2 määritettyjen herkkyyssparametrien  $S$  suuruus molemmilla tekniikoilla oli noin kolme kertaa pienempi kuin kirjallisuusarvo samassa lämpötilassa TERG-tekniikalla mitattuna [50]. Myös TTP-

arvot ovat huomattavan nopeita [54]. Tällainen käytös on ominaista valoadaptoituneen verkkokalvon vasteille. Valoadaptaatio nopeuttaa vasteiden katkaisua, joten mitatut vasteet ovat pimeäadaptoituneita vasteita nopeampia ja amplitudiltaan pienempiä [50]. Valoadaptaatio ei vaikuta valovasteen aktivaatioon tai  $\tau_D$ :n arvoon [55]. Pipetin aiheuttama vahinko voi aiheuttaa LERG-vasteiden epäherkistymistä, mutta se ei vaikuta TERG-vasteisiin. Myös valostimuluksen maksimivoimakkuuden arviointi todellista suuremmaksi nähtäisiin vasteiden näennäisenä epäherkistymisenä. Ilmeisesti verkkokalvot ovat olleet lievästi valoadaptoituneita tehdyissä kokeissa joko verkkokalvon monitoroinnin tai vuotovalon takia, mikä on todennäköisesti ainakin osasyynä poikkeamiin kirjallisuusarvoista.

### 7.1.1 Valovirran osuus näköaistinsolujen TERG-signalista

Valovirran muodostavan virtasilmukan osuus näköaistinsolujen ERG-vasteiden muodostumisessa voidaan arvioida karkeasti Hagins ym. rotalle julkaiseman resistiivisyysprofiilin sekä yhtälön (22) perusteella [9]. Yhtälössä valovirran lähteiden oletetaan jakautuneen tasaisesti ulkojäsenen pituudella ja nielujen koko sisäjäsenen alueelle, joten maksimivirta saadaan ciliumin kohdalla. Yksittäisen rotan sauvasolun kalvovirran suuruudeksi on mitattu n. 10 pA, joka vastaa ciliumin kohdalla soluvälitilassa kiertävää virtaa yhtä sauvasolua kohti [18]. Sauvasolujen tiheydeksi oletetaan  $d = 3 \cdot 10^7$  sauva/cm<sup>2</sup> m. Siten saadaan rotan pimeävirrantiheyden maksimiksiarvoksi  $i_{max} = d \cdot J_{circ} \approx 0,3 \text{ mA/cm}^2$ . Keskimääräiseksi resistiivisyydeksi saadaan ulkojäsenkerroksessa  $\rho_u \approx 100 \text{ } \Omega \text{ cm}$  ja tiukemmin pakatussa sisäjäsenkerroksessa  $\rho_s \approx 500 \text{ } \Omega \text{ cm}$  [44]. Tämä on karkea arvio Hagins ym. rekisteröimästä näköaistinsolukerroksen resistiivisyysprofiilista [9]. Lisäksi tarvittavat ulkojäsenen ja sisäjäsenen pituudet ovat  $z_u = 24 \text{ } \mu\text{m}$  ja  $z_s = 73,3 \text{ } \mu\text{m}$  [9]. Yhtälöä (22) joudutaan hieman muokkaamaan vastaamaan annettuja yksiköitä, jolloin se saa muodon

$$\Delta V \approx i_{max} A \left( \frac{\rho_u z_u}{2A} + \frac{\rho_s z_s}{2A} \right). \quad (27)$$

Sijoittamalla arvot yhtälöön saadaan jännitemuutokseksi  $\Delta V \approx 0,6 \text{ mV}$ . Tämän arvion perusteella ERG-vasteesta muodostuisi ulkojäsenkerroksessa 6 % ja sisäjäsenkerroksessa 94 %. Tulos vastaa melko hyvin myös kokeellisesti havaittua hiiren näköaistinsolujen ERG-vasteen saturaatioamplitudia hyväkuntoisessa verkkokalvossa. Tämän työn tuloksena saatiin, että näköaistinsolujen ERG-vasteista syntyy n.  $13 \pm 7$  % ulkojäsenkerroksessa. Tämä vastaa hyvin yksittäisen kokeen tulosta, jossa ERG-vasteita rekisteröitiin LERG-tekniikalla sekä ulkojäsenkerroksesta että näköaistinsolujen synaptiselta alueelta. Ulkojäsenkerroksessa syntyvän vasteen suhteelliseksi osuudeksi saatiin näin 10 % näköaistinsolukerroksen ERG-vasteista. Myös Hagins ym. tutkimuksissa saatiin samansuuntaisia tuloksia ulko- ja sisäjäsenkerroksessa syntyvien vasteiden suhteesta. He saivat LERG-tekniikalla rotan ERG-vasteen maksimiampitudiksi 30  $\mu\text{m}$  syvyydellä on n. 18 % synapsialueella mitatusta vasteesta [9]. Tällöin ulkojäsenkerroksessa ( $z_u = 24 \text{ } \mu\text{m}$ ) muodostuva vaste olisi tästä pienempi.

### 7.1.2 Kinetiikka

Kirjallisuudessa aktivaatiomallin sovituksissa on saatu hiiren sauvasolujen vahvistuskertoimeksi imupipettitekniikalla  $A = 8,3 \pm 1,4$  [54] ja TERG-tekniikalla  $A = 5,6 \pm 0,7$  [56]. Elävän hiiren *in vivo*-ERG-vasteista määritetyn aktivaatiovakion arvo on myös samaa luokkaa ( $A = 7,2 \pm 1,5$ ) [57]. Sovitus tehdään *in vivo*-ERG-kokeissa a-aallon kärkeen, koska vasteissa ei nähdä saturaatiotilaa kuten TERG-vasteissa. Aktivaatiomallin sovituksista kokeen 1 tulokset ovat lähellä kirjallisuusarvoja. Työssä tehtyjen sovitusten välillä on kuitenkin suurta hajontaa. Työn sovituksissa saatiin viitteitä, että TERG-vasteiden aktivaatio olisi ulkojäsenvasteita nopeampaa. Tämä viittaisi, että nenäkomponentti ei ajallisesti seuraa CNG-kanavavirtan muutosta, vaan muodostuu erillisenä komponenttina jo vasteen alkuvaiheessa. Kirjallisuudesta saatujen tulosten perusteella taas ulkojäsenvirtaa mittaavalla imupipettitekniikalla mitattujen vasteiden aktivaatiot ovat ERG-vasteita nopeampia.

Hiirelle julkaistuja  $\tau_D$ :n ja  $\tau_{rec}$ :n arvoja on esitetty taulukossa 8. Aikavakioiden arvot ovat määritetty imupipettitekniikalla. Ainoastaan Vinberg ym. ja Lyubarsky ym. julkaisuissa on käytetty TERG-tekniikkaa [23] ja *in vivo*-ERG-tekniikkaa [57]. Kirjallisuusarvoissa havaitaan suurta hajontaa, jota aiheuttavat oletettavasti eri tutkimuksissa käytetyt toisistaan poikkeavat elatusliuokset sekä eri hiirikannat. Saman tutkimusryhmän julkaisemat  $\tau_D$ :n ja  $\tau_{rec}$ :n arvot vastasivat toisiaan kahdessa tapauksessa [20], [58], mutta poikkesivat yhdessä tapauksessa [60]. Tässä työssä ulkojäsenkerroksesta mitattujen  $\tau_D$ :n ja  $\tau_{rec}$ :n arvot olivat kirjallisuusarvoja pienempiä. TERG-tekniikalla saatu  $\tau_D$ :n arvo oli virherajat huomioon ottaen samaa luokkaa kirjallisuusarvojen kanssa, mutta  $\tau_{rec}$ -arvo oli huomattavasti pienempi. molemmilla tekniikoilla  $\tau_D$ :n ja  $\tau_{rec}$ :n määrittämisen poikkeamiin kirjallisuusarvoista vaikutti todennäköisimmin liian pieni otanta. LERG-tekniikalla määrittäminen vaikeuttaa tekniikan huono signaali-kohinasuhde. Jotta voidaan luotettavasti määrittää  $\tau_D$ :n ja  $\tau_{rec}$ :n arvot LERG- ja TERG-tekniikoilla, tarvitaan enemmän stabiileja tuloksia. Jatkossa pyritään tekemään pidempikestoisia kokeita, joissa suurella keskiarvoistuksella parannetaan LERG-tekniikan signaali-kohinasuhdetta sekä molemmilla tekniikoilla saatujen vasteiden luotettavuutta.

## 7.2 Laitteiston jatkokehitys

Nykyistä laitteistoa voidaan hyvin käyttää LERG- ja TERG-vasteiden rekisteröintiin. Vasteet olivat toistuvia valostimulusten välillä, mutta pitkään kestäneissä kokeissa vasteiden amplitudit laskivat. Stabiileja vertailukelpoisia vasteita saatiin rekisteröityä n. tunnin ajan. Suurin ongelma oli elatusainevirtausletkuissa elatusaineeseen muodostuvat kaasukuplat, jotka aiheuttivat hetkellisiä virtausnopeuden vaihteluja sekä liikuttivat verkkokalvoa näytepitimessä. Virtausnopeuden vaihtelut saivat verkkokalvon liikahtelemaan. Siten LERG-mittauspipetin syvyys verkkokalvon pintaan nähden muuttui ja samalla mittauspipetti aiheutti vahinkoa rekisteröinnin kohteena oleville soluille. Kaasukupla saattoi myös irrotessaan osua verkkokalvon pintaan, mikä myös vahingoitti soluja. Kun näin tapahtui, vasteiden rekisteröinti

Taulukko 8: Hiiren  $\tau_D$  ja  $\tau_{rec}$  kirjallisuusvertailu saatuihin tuloksiin. Vinberg ym. tutkimus on tehty TERG-tekniikalla ja Lyubarsky ym. tulokset *in vivo* -ERG-tekniikalla, mutta muuten kirjallisuusarvot on saatu imupipettimittauksista.

	$\tau_D$ (ms)	$\tau_{rec}$ (ms)
Gross, Burns (2010)	$204 \pm 17$ (n=8) [20]	$220 \pm 10$ (n=18) [20]
Vinberg ym. (2010)	$180 \pm 6$ (n=15) [55]	
C. Chen ym. (2010, 2000)	$185 \pm 11$ (n=21) [58]	$180 \pm 10$ (n=12) [59]
Krispel ym. (2006)	$246 \pm 13$ (n=29) [60]	$190 \pm 9$ (n=33) [60]
Nikonov ym. (2006)	$235 \pm 20$ (n=26) [54]	
Doan ym. (2009)	$320 \pm 10$ (n=15) [61]	
J. Chen ym. (2010)	$185 \pm 11$ (n=25) [62]	
Lyubarsky ym. (1996)	$206 \pm 53$ (n=5) [57]	
Diplomityö LERG	$130 \pm 30$ (n=5)	$150 \pm 40$ (n=2)
Diplomityö TERG	$160 \pm 50$ (n=5)	$100 \pm 20$ (n=2)

jouduttiin keskeyttämään, verkkokalvon annettiin stabiloitua uuteen tilaan ja valittiin uusi mittaush kohta.

Kaasukuplien muodostus johtui todennäköisesti elatusaineen lämpötilavaihteluista. Kaasujen liukoisuus veteen pienenee lämpötilan kasvaessa [63]. Huoneenlämmössä kuplittamalla saturoitu elatusaineliuos jouduttiin riittävän verkkokalvon lämpötilan saavuttamiseksi lämmittämään ennen näytepidintä erillisellä lämmönvaihtimella, jonka takia liukseen pääsi ydintymään kaasukuplia lämmityksen aikana. Kaikki kaasukuplat eivät ehtineet liueta takaisin elatusaineliuokseen liuksen jäähtyessä ennen verkkokalvoa, vaan sulautuivat yhteen aiheuttaen rekisteröintiä häiritsevän kaasukuplan.

Kaasukuplien aiheuttamia ongelmia pystyttiin vähentämään käyttämällä kuvan 20 b mukaista suojattua verkkokalvonpidintä. Tällöin kaasukuplat eivät osuneet verkkokalvoon, mutta virtausnopeuden vaihteluihin ratkaisu ei vaikuttanut. Kaasukuplien muodostus pyritään jatkossa estämään poistamalla virtausjärjestelmästä lämpönierut. Siten liuksen lämpötilaa ei tarvitse nostaa merkittävästi verkkokalvon lämpötilaa korkeammalle. Tämä vähentää kaasukuplien muodostuu liukseen.

Muita tulevia kehityksenkohteita ovat verkkokalvon häiriövalosuojaus ja yleinen sähköisten häiriötasojen minimointi. Mahdolliset hajavalolähteet minimoidaan sekä valon pääsy verkkokalvolle estetään parantamalla Faradayn häkin valosuojauksella. Lisäksi verkkokalvon irrotukseen ja mittauselektrodien etsintään käytetty heikko punainen valo tullaan korvaamaan pimeänäkölaitteella, joka ei stimuloi verkkokalvon soluja.

Nykyisessä laitteistossa hallitseva sähköisten häiriöiden aiheuttaja on LERG-mittauselektrodin suuri resistanssi. LERG-tekniikassa kohinataso oli kymmenkertainen TERG-tekniikan kohinatasoon verrattuna. LERG-mittauselektrodin resistanssia voidaan pienentää optimoimalla mittauspipetin kärjen halkaisijaa ja mittauspipetis-

sä käytetyn suolaliuoksen vahvuutta. Kärjen halkaisijan suurentaminen ja pipettiliuoksen vahvistaminen pienentävät resistanssia. Pipetin halkaisijan täytyy olla kuitenkin riittävän pieni, ettei se aiheuta merkittävää vahinkoa mitattavissa soluissa. Jatkossa tutkitaan pipetin halkaisijan vaikutusta mitattaviin soluihin ja valitaan tarkoitukseen sopivin pipetin kärjen koko. Pipettiliuoksen väkevöittäminen lisää ionien diffuusiovirtausta pipetistä näytepitimeen, mikä aiheuttaa signaalitason huojuun. Myös pipetin kärjen halkaisijan kasvatus lisää ionienvaihtoa pipettiliuoksen ja näytepitimen nesteen välillä. Eri pitoisuuksia testaamalla pyritään jatkossa löytämään sopivin pitoisuus häiriöiden minimoimiseksi.

### 7.2.1 Näytepidin

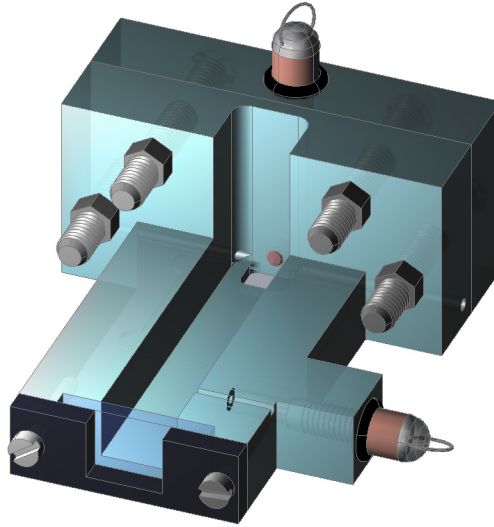
Nykyisessä näytepitimessä yksi suurimmista ongelmista on kosteuden tiivistyminen tai vuotaminen näytepitimen ulkopuolelle, jolloin näytepitimestä voi syntyä nesteyhteys signaalimaahan. Nykyisessä näytepitimessä sähköinen yhteys voi muodostua myös suoraan verkkokalvon puoltien välille, jos verkkokalvon pitimen tiivistys tai kiinnitys epäonnistuu. Nykyisen verkkokalvon pitimen koko ja muoto eivät ole täysin optimaalisia hiiren verkkokalvolle. Tämä voi heikentää mittausten ajallista stabiiliutta.

Uutta näytepidintä kehitettäessä minimoidaan mahdolliset vuotovirtareitit. Vuotovirran mahdollisuudet eliminoidaan näytepitimen tiiviimmillä liitoksilla ja suuremmilla materiaali vahvuuksilla. Verkkokalvolle suunnitellaan pidin, jossa ei pysty olemaan sähköistä vuotoa verkkokalvon ohi. Pitimen korokkeesta työstetään leikattu kartio, jonka pohjan halkaisija on 4 mm ja päädyn 2 mm. Vastinosa työstetään tähän sopivaksi. Tämän kaltaisen ratkaisun on todettu toimivan TERG-rekisteröinneissä. Tulevassa ratkaisussa käytetään markoelektrodeja, joiden liuostila on eristetty elatusaineliuksesta, joten elektrodien huokosiin pääsee glukosia. Näytepitimen seuraava kehitysversio on kuvassa 31.

### 7.2.2 Lämmitys

Diplomityön mittauksissa verkkokalvo pidettiin 37°C lämpötilassa. Lämmitys toteutettiin lämmittämällä elatusaineliuosta siten, että liuosvirtaus asetti verkkokalvon sopivaan lämpötilaan. Näytepidintä ei lämmitetty erikseen, joten se toimi lämpönäiluna. Siten verkkokalvon ympäristöön syntyi lämpötilagradientteja, jotka saattoivat aiheuttaa kaasukuplien ydintymisen elatusaineliukseen. Lisäksi käytetyssä geometriassa lämpötila on hyvin riippuvainen virtausnopeudesta, joten virtausnopeutta ei voi säädellä vaikuttamatta verkkokalvon lämpötilaan.

Jatkossa laitteistoon suunnitellaan lämmitysjärjestelmä, joka pitää näytepitimen lämpötilan tasaisena koko kokeen ajan. Siten verkkokalvon ympäristöön ei synny lämpötilagradientteja eikä lämpötila ole herkkä virtausnopeuden muutoksille. Lisäksi näytepidin eristetään kotelolla, joka vähentää lämmönsiirtoa ympäristöön ja suojaa samalla verkkokalvoa häiriövaloilta. Lämmitysjärjestelmä toteutetaan mes-



Kuva 31: Näytepidinratkaisun seuraava kehitysversio. Näytepidin rakennetaan kahdesta osasta, joissa toisessa on verkkokalvolle sopiva koroke ja toisessa korokkeeseen sovitettu upotus. Osat kiristetään yhteen ruuvikiinnityksellä. Toisesta nestealtaasta luovutaan ja se korvataan nestekanavalla, joka on yhteydessä makroelektrodiin. Rajapintojen tiiveys toteutetaan tiivisteillä ja tyhjiörasvan käytöstä pyritään luopumaan.

sinkisenä lämmönvaihtimella, johon tehdään upotus näytepitimelle. Lämmönvaihdin eristää näytepitimen ympäristöstä ja samalla lukitsee näytepitimen paikoilleen.

### 7.2.3 Valostimulusjärjestelmän automatisointi ja optimointi

Valostimulaatiomahdollisuuksien monipuolisuutta kasvatetaan tulevaisuudessa lisäämällä järjestelmään useilla LEDejä eri spektreillä. LEDit kytketään kiekkoon, jota pyöritetään askelmoottorin avulla. Siten tietokoneelta voidaan valita molemmille kanaville erikseen käytettävä LED ja saman kokeen aikana voidaan käyttää monipuolisempia valostimuluskombinaatiota.

Tällä hetkellä valosäde ei tule näköaistinsoluille täysin niiden optisen akselin suuntaisesti. Siten mitatun valon voimakkuuden aiheuttama rodopsiinien aktivaatioiden määrä voi hieman poiketa todellisesta aktivaatioiden määrästä. Jatkossa valostimuluksen kohdistusta parannetaan ja valotehoa optimoidaan, jotta LEDien valovoimakkuuden dynaaminen alue saadaan käytettyä mahdollisimman tehokkaasti hyödyksi.

## 8 Yhteenveto

Diplomityössä suunniteltiin ja toteutettiin laitteisto ERG-signaalin samanaikaiseen rekisteröintiin näköaistinsolukerroksesta ja verkkokalvon yli. Laitteisto rakennettiin Aalto-yliopiston lääketieteellisen tekniikan ja laskennallisen tieteen laitoksen laboratoriotiloihin.

Laitteistokokonaisuudesta saatiin toimiva, vaikka selviä kehityskohteitakin on mm. vasteiden stabiiliuden säilyttämisessä kokeen kuluessa. Hiiren näköaistinsolujen ulkojäsenvasteita mitattiin ensimmäistä kertaa lokaali-ERG-tekniikalla (LERG). Saatut ulkojäsenvasteet näyttivät lupaavilta, joten tekniikkaa voidaan alkaa käyttää näköaistin toiminnan kvantitatiiviseen tutkimukseen. Teknisesti helpommalla verkkokalvon yli mitattavalla ERG-tekniikalla (TERG) saatiin rekisteröityä vasteita hyvällä signaali-kohinasuhteella. Mittausten stabiiliutta täytyy kuitenkin kehittää, koska vasteet pysyivät riittävän stabiilina vain n. tunnin ajan työn mittausjärjestelyllä.

Laitteistoa testattiin koeohjelmalla, jolla pyrittiin selvittämään, muokkaavatko näköaistinsolujen sisäjäsenen jänniteherkät kanavat ulkojäsenen CNG-kanavien sulkeutumisen seurauksena muodostuvaa ERG-vastetta. LERG-tekniikalla saadaan rekisteröityä CNG-kanavien valovirtaan suoraan verrannollista jännitesignaalia ulkojäsenkerroksesta. Kun farmakologisesti erotettuja näköaistinsolujen TERG-vasteita ja LERG-vasteita verrattiin, niiden todettiin heijastelevan samaa näköaistinsolujen toiminnallisuutta. Vasteiden nousunopeus, katkaisukinetiikka, nousuaika huippuarvoon sekä vasteiden suhteelliset amplitudit poikkesivat virherajojen puitteissa vain vähän toisistaan tekniikoiden välillä. Suurin eroavaisuus nähtiin voimakkailla valostimuluksilla. Tällöin TERG-vasteiden nousevaan reunaan muodostui nopea transientti aalto, jota ei nähty ulkojäsenvasteissa. Myös TERG-vasteiden paluuvaiheessa nähtiin vaihtelevasti kokeiden välillä LERG-vasteista poikkeavia aaltomuotoja. Eroavaisuudet olivat todennäköisesti seurausta sisäjäsenen jänniteherkkien kanavien toiminnasta valovasteen aikana.

Koeohjelman tuloksia verrattiin kirjallisuudessa julkaistuihin arvoihin. Rekisteröity valovasteet olivat pääsääntöisesti epäherkempiä ja nopeampia kuin kirjallisuudessa julkaistut. Tämä voi johtua verkkokalvojen mahdollisesta valoadaptaatiosta kokeen aikaisen hajavalon seurauksena. Ero voisi osin selittyä myös liian suureksi arvioidusta valostimulusten voimakkuudesta. Myös LERG-vasteista määritetty katkaisukinetiikkaa kuvaava aikavakio  $\tau_D$  oli kirjallisuusarvoja pienempi, vaikka valoadaptaation ei uskota vaikuttavan aikavakion arvoon. Tämä voi johtua tekniikan huonon signaali-kohinasuhteen vaikeuttamasta analyysistä.

Laitteiston kehittämistä jatketaan suunnittelemalla ja toteuttamalla uudet näytepidin- ja lämmitysjärjestelmäratkaisut. Lisäksi valostimulusjärjestelmää monipuolistetaan lisäämällä useita uusia LEDejä eri spektreillä. Valostimuluksen intensiteettiä parannetaan optimoimalla valon siirtoon käytettyä optiikkaa. Häiriövalosuojausta kehitetään parantamalla Faradayn häkin valotiiveyttä. Uudistuksilla parannetaan verkkokalvon elinolosuhteita ja mahdollistetaan stabiilien pitkäkestoisten kokeiden suoritus TERG- ja LERG-tekniikoilla.



## Viitteet

- [1] J. Bjälle *Ihminen - Fysiologia ja anatomia* WSOY, 1.-5. painos, ISBN 978-951-0-23087-9, 2008
- [2] S. Mader *Understanding human anatomy & physiology* 5th edition. The McGrawHill Companies, s. 170, 2004
- [3] C. Curcio, K. Sloan, R. Kalina, A. Hendrickson *Human photoreceptor topography* The Journal of Comparative Neurology, vol. 292, s. 497-523, 1990
- [4] R. Rodieck *The First Steps in Seeing* Sinauer Associates, Inc., 1998
- [5] D. Mustafi, A. Engel, K Palczewski *Structure of cone photoreceptors* Progress in Retinal and Eye Research, vol. 28(4), s. 289-302, 2009.
- [6] M. Tessier-Lavigne *Principles of Neural Science: Phototransduction and Information Processing in the Retina* 3. painos, Appleton & Lange, 1991
- [7] R. Masland *The fundamental plan of the retina* Nature Neuroscience, vol. 4(9), 2001
- [8] R. Young *The renewal of photoreceptor cell outer segments* The Journal of General Physiology, vol. 33(1), s. 61-72, 1967
- [9] W. Hagins, R. Penn, S. Yoshikami *Dark current and photocurrent in retinal rods* Biophysical journal, vol. 10, s. 380-412, 1970
- [10] W. Ehrhardt, C. Baumann *The spatial distribution of currents in the receptor layer of the frog retina* Biological cybernetics, vol. 25, s. 155-162, 1977
- [11] X. Yang, S. Wu *Response Sensitivity and Voltage Gain of the Rod- and Cone-Bipolar Cell Synapses in Dark-Adapted Tiger Salamander Retina* The Journal of Neurophysiology, vol 78, s. 2662-2673, 1997
- [12] A. Miani *Photoreceptors of the Larval Tiger Salamander Retina* Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences Vol. 227(1249), s. 483-492, 1986
- [13] M. Nachman-Clewner, E. Townes-Anderson *Injury-induced remodelling and regeneration of the ribbon presynaptic terminal in vitro* The Journal of Neurocytology, Volume 25(1), s. 597-613, 1996
- [14] J. Bowmaker, H. Dartnall *Visual pigment of rods and cones in human retina* The Journal of Physiology, vol. 298, s. 501-511, 1980
- [15] A. Lyubarsky, B. Falsini, M. Pennesi, et al. *UV- and Midwave-Sensitive Cone-Driven Retinal Responses of the Mouse: A Possible Phenotype for Coexpression of Cone Photopigments* The Journal of Neuroscience, vol. 19, s. 442-455, 1999

- [16] E. Pugh Jr., T. Lamb *Phototransduction in vertebrate rods and cones: Molecular mechanisms of amplification, recovery and light adaptation* Handbook of Biological Physics, vol. 3, s. 183-255, 2000
- [17] J. Dowling *The Retina: An Approachable Part of the Brain* Belknap Press, Harvard, 1987
- [18] D-G. Lou, K-W. Yau *Rod Sensitivity of Neonatal Mouse and Rat* The Journal of General Physiology, vol. 126(3), s. 263-269, 2005
- [19] T. Lamb, E. Pugh Jr *A quantitative account of the activation steps involved in phototransduction in amphibian photoreceptors.* The Journal of Physiology, vol. 449 s. 719-758, 1992
- [20] O. Gross, M. Burns *Control of Rhodopsin's Active Lifetime by Arrestin-1 Expression in Mammalian Rods* The Journal of Neuroscience, vol. 30(9), s. 3450 - 3457, 2010
- [21] D. Pepperberg, M. Cornwall, M. Kahlert, et al. *Light-dependent delay in the falling phase of the retinal rod photoresponse* Visual Neuroscience, vol 8, s. 9-18, 1992
- [22] S. Nikonov, N. Engheta, E. Pugh Jr. *Kinetics of Recovery of the Dark-adapted Salamander Rod Photoresponse* The Journal of General Physiology, vol. 111(1), s. 7-37, 1998
- [23] F. Vinberg, A. Koskelainen *Calcium Sets the Physiological Value of the Dominant Time Constant of Saturated Mouse Rod Photoresponse Recovery* PloS ONE, vol. 5, e13025, 2010
- [24] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, et al. *Molecular Biology of THE CELL* 5th edition, Garland science, Taylor & Francis Group, United Kindom, s. 654-693, 2008
- [25] T. Weiss *Cellular Biophysics, Vol. 2, Electrical Properties* The MIT-press, 1996
- [26] P. Nelson *Biological Physics - Energy, Information, Life* W.H. Freeman and Company, New York, 2004
- [27] R. Warren, R.Molday *Rod photoreceptor cyclic nucleotide gated channel, Advances in experimental medicine and biology*, vol. 514, s. 205-230, 2002
- [28] A. Barrow, S. Wu *Low-Conductance HCN1 Ion Channels Augment the Frequency Response of Rod and Cone Photoreceptors* The Journal of Neuroscience, vol. 29(18), s. 5841-5853, 2009
- [29] F. Vinberg *Ionic mechanisms in mouse rod photoreceptor signaling* Väitöskirja, Aalto-yliopisto, Lääketieteellisen tekniikan ja laskennallisen tieteen laitos, 2011

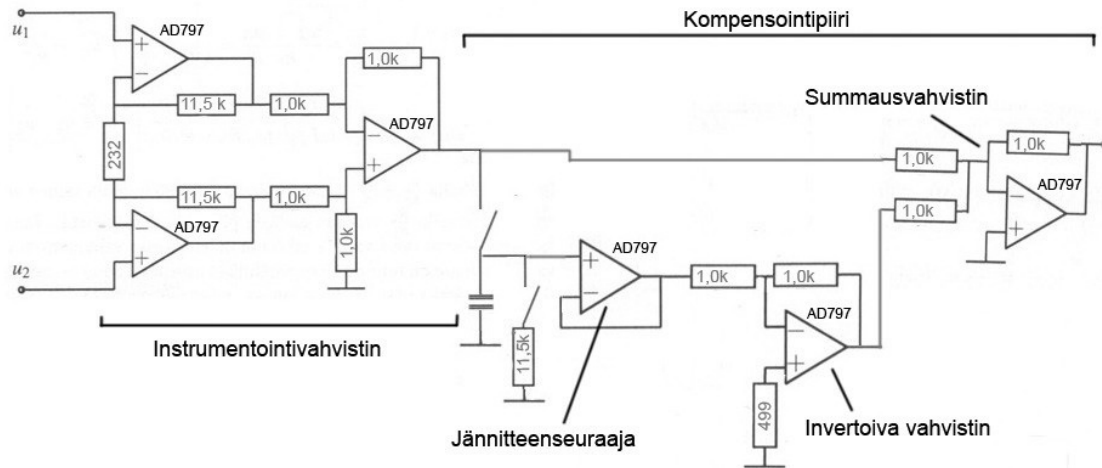
- [30] Y. Kamiyama, T. Ogura, S. Usui *Ionic Current Model of the Vertebrate Rod Photoreceptor* Vision Research, vol. 36(24), s. 4059-4068, 1996
- [31] D. Baylor, B. Nunn *Electrical properties of the light-sensitive conductance of rods of the salamander ambystoma tigrinum* The Journal of Physiology, vol. 371, s.115-145, 1986
- [32] D. Cia, A. Bordais, C. Varela, et al. *Voltage-Gated Channels and Calcium Homeostasis in Mammalian Rod Photoreceptors* The Journal of Neurophysiology, vol. 93, s. 1469-1475, 2005
- [33] L. Baumann, A. Gerstner, Xi. Zong, et al. *Functional Characterization of the L-type  $Ca^{2+}$  Channel  $Ca_v1.4\alpha1$  from Mouse Retina* Investigative Ophthalmology & Visual Science, vol. 45(2), s. 708-713, 2004
- [34] A. Moriondo, B. Pelucchi, G. Rispoli *Calcium-activated potassium current clamps the dark potential of vertebrate rods* European Journal of Neuroscience, vol. 14, s. 19-26, 2001
- [35] S. Barnes, Q. Bui *Modulation of Calcium-activated Chloride Current via pH-induced Changes of Calcium Channel Properties in Cone Photoreceptors* The Journal of Neuroscience, vol. 11(12), s. 4015-4023, 1991
- [36] R. Granit *The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve* The Journal of Physiology, vol. 77, s.207-240, 1933
- [37] <http://webvision.med.utah.edu/imageswv/ERGFig2.jpg>, katsottu 11.8.2010
- [38] <http://webvision.umh.es/webvision/imageswv/ERGFig4.jpg>, katsottu 12.3.2011
- [39] J. Dowling, H. Ripps *Adaptation in skate photoreceptors* The Journal of General Physiology, vol. 60, s. 698-719, 1972
- [40] M. Slaughter, R. Miller *2-amino-4-phosphonobutyric acid: A new pharmacological tool for retina research* Science, vol. 211, s. 182-185, 1981
- [41] M. Slaughter, R. Miller *An excitatory amino acid antagonist blocks cone input sign-conserving second-order retinal neurons* Science, vol. 219, s. 1230-1232, 1983
- [42] D. Bolnick, A. Walter, A. Sillman *Barium suppresses slow PIII in perfused bullfrog retina* Vision Research, vol. 19, s. 1117-1119, 1979
- [43] F. Vinberg *Hiiren eristetyn verkkokalvon ERG:n nopean PIII-komponentin tutkimus* Diplomityö, Teknillinen korkeakoulu, Teknillisen fysiikan ja matematiikan osasto, Espoo, 2005

- [44] E. Pugh, B. Falsini, A. Lyubarsky *The origin of the major rod- and cone-driven components of the rodent electroretinogram and the effect of age and light-rearing history on the magnitude of these components* Photostasis and Related Topics, Kappale 7, s. 93-128, 1998
- [45] Philips LUMILEDS *LUXEON Rebel and LUXEON Rebel ES Color Portfolio - Technical Datasheet DS68* <http://www.philipslumileds.com/products/luxeon-rebel/luxeon-rebel-color>, katsottu 6.11.2011
- [46] L. Carter-Dawson, M. LaVail *Rods and cones in the mouse retina* The Journal of Comparative Neurology, vol. 188, s. 245-262
- [47] H. Dartnall *The photosensitivities of visual pigments in the presence of hydroxylamine* Vision Research, vol. 8, s. 339-358
- [48] S. Virtanen *LED-valojärjestelmän suunnittelu ja rakentaminen hiiren näköäistin tutkimusta varten* Erikoistyö, Aalto yliopiston teknillinen korkeakoulu, Teknillisen fysiikan ja matematiikan laitos, Espoo, 2010
- [49] D. Baylor, G. Matthews, B. Nunn *Location and function of voltage-sensitive conductances in retinal rods of the salamander, ambystoma tigrinum* The Journal of Physiology, vol 354, s. 203-223, 1984
- [50] S. Nymark, H. Heikkinen, C. Haldin et al. *Light responses and light adaptation in rat retinal rods at different temperatures* The Journal of Physiology, vol. 567, s. 923-938, 2005
- [51] V. Govardovskii, N. Fyhrquist, T. Reuter, D. G. Kuzmin, K. Donner *In search of the visual pigment template* Visual Neuroscience, vol. 17, s. 509-528, 2000
- [52] H. Säteri *Esivahvistin eristetyn verkkokalvon ERG rekisteröintiin* Kandidaatin työ, Aalto yliopiston teknillinen korkeakoulu, Elektroniikan, tietoliikenteen ja automaation tiedekunta, Espoo, 2010
- [53] J. Robson, L. Frishman *Sampling and interpolation of the a-wave of the electroretinogram* Documenta Ophthalmologia, vol. 108, s. 171-179, 2004
- [54] S. Nikonov, R. Kholodenko, J. Lem, et al. *Physiological Features of the S- and M-cone Photoreceptors of Wild-type Mice from Single-cell Recordings* The Journal General Physiology, vol. 127(4), s. 359-374, 2006
- [55] F. Vinberg, H. Heikkinen, A. Koskelainen *Extensive Modulation of  $R^*$  but Not  $PDE^*$  Lifetime by Light in Mouse Rods when Registered in the Intact Retina*. ARVO Meeting Abstracts, 52:6575, April 22, 2011.
- [56] H. Heikkinen, S. Nymark, A. Koskelainen *Mouse cone photoresponses obtained with electroretinogram from the isolated retina* Vision Research, vol. 48, s. 264-272, 2008

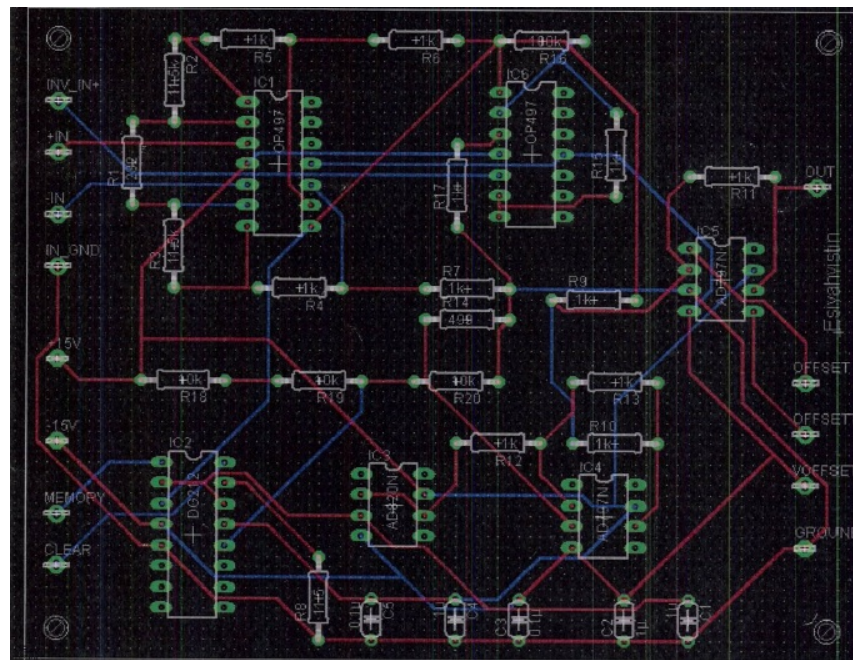
- [57] A. Lyubarsky, E. Pugh Jr. *Recovery Phase of the Murine Rod Photoresponse Reconstructed from Electroretinographic Recordings* The Journal of Neuroscience, vol. 16(2), s. 563-571, 1996
- [58] C. Chen, M. Woodruff, F. Chen, et al. *Background Light Produces a Recoverin-Dependent Modulation of Activated-Rhodopsin Lifetime in Mouse Rods* The Journal of Neuroscience, vol 30(4), s. 1213-1220, 2010
- [59] C. Chen, M. Burns, W. He, et al. *Slowed recovery of rod photoresponse in mice lacking the GTPase accelerating protein RGS9-1* Nature, vol. 403, s. 557-560, 2000
- [60] C. Krispel, D. Chen, N. Melling *RGS Expression Rate-Limits Report Recovery of Rod Photoresponses* Neuron, vol. 51, s. 409-416, 2006
- [61] T. Doan, A. Azevedo, J. Hurley, F. Rieke *Arrestin Competition Influences the Kinetics and Variability of the Single-Photon Responses of Mammalian Rod Photoreceptors* The Journal of Neuroscience, vol. 29(38), s. 11867-11879, 2009
- [62] J. Chen, M. Woodruff, T. Wang, et al. *Channel Modulation and the Mechanism of Light Adaptation in Mouse Rods* The Journal of Neuroscience, vol. 30(48), s. 16232-16240, 2010
- [63] D. Eley *On the solubility of gases. Part I. -The inert gases in water* Transactions of the Faraday Society, vol. 35, s. 1281-1293, 1939

## Liite A Esivahvistin

Esivahvistimen instrumentointivahvistinkytkenässä alunperin käytetyt operaatiovahvistimet (AD797) on korvattu OP497 nelikkovahvistimella, jonka operaatiovahvistimilla on huomattavasti suurempi sisäänmenoimpedanssi. Tällöin mittauspiirin suuri resistanssi ei vaikuta esivahvistimen ominaisuuksiin. Esivahvistimen piirikaavio on esitetty kuvassa A1 ja piirilevy komponentteineen kuvassa A2.



Kuva A1: Differentiaaliseen vahvistinkytkentään perustuvan esivahvistimen piirikaavio. [52]



Kuva A2: Esivahvistin piirilevy komponentteineen.